

**GEMCITABIN IM MODELL DER AKUTEN UND AKZELERierten
TRANSPLANTATABSTOSSUNG**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Florian Johannes Jung
aus Gießen

Gießen 2002

Aus dem Medizinischem Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik für Allgemeinchirurgie
Leiter: Prof. Dr. med. K. Schwemmle
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. med. S. Korom
Gutachter: Prof. Dr. med. A. Reiter

Tag der Disputation: 18.07.2003

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	<u>Historischer Überblick</u>	1
1.1.1	Organtransplantation	1
1.1.2	Transplantationsimmunologie	3
1.1.3	Immunsuppression	8
1.1.4	Gemcitabin	18
1.2	<u>Nierentransplantation beim Menschen</u>	23
1.2.1	Indikationen und Kontraindikationen der Nierentransplantation	23
1.2.2	Operationsverfahren	24
1.2.3	Klinische Ergebnisse	27
1.3	<u>Herztransplantation beim Menschen</u>	28
1.3.1	Indikationen und Kontraindikationen der Herztransplantation	28
1.3.2	Operationsverfahren	29
1.3.3	Klinische Ergebnisse	31
1.4	<u>Problemstellung und Zielsetzung</u>	33

2. Material und Methoden

2.1	<u>Versuchsablauf</u>	35
2.1.1	Modell der akuten Nierenabstoßung	35
2.1.2	Modell der akuten Herzabstoßung	36
2.1.3	Modell der akzelerierten Herzabstoßung	37
2.2	<u>Versuchstiere</u>	38
2.2.1	Auswahl der Versuchstiere	38
2.2.2	Tierversuchsgenehmigung	38
2.2.3	Tierhaltung	39
2.3	<u>Etablierung und Optimierung einer Nierentransplantationstechnik</u>	39
2.3.1	Nierentransplantation an der Ratte	39
2.3.2	Narkose	40

2.4	<u>Operationsverfahren</u>	41
2.4.1	Narkose	41
2.4.2	Operationsvorbereitung	41
2.4.3	Orthotope Nierentransplantation	43
2.4.4	Heterotope Herztransplantation	48
2.4.5	Nephrektomie	52
2.4.6	Hauttransplantation	52
2.4.7	Blutentnahme	52
2.5	<u>Kontrolle der Transplantatfunktion</u>	53
2.5.1	Nierenmodell	53
2.5.2	Herzmodell	53
2.6	<u>Immunsuppressive Protokolle</u>	54
2.7	<u>In vitro Untersuchungen</u>	54
2.7.1	Gesamt IgM- und IgG-Spiegelbestimmungen	54
2.7.2	Allospezifische IgM- und IgG-Spiegelbestimmungen	55
2.7.3	Zytotoxizitätstest	56
2.7.4	Gemischte Lymphozytenproliferation (MLR)	57
2.7.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	59
2.8	<u>Versuchsgruppen</u>	60
2.8.1	Transplantatüberlebenszeiten	60
2.8.2	Gesamt IgM- und IgG-Blutspiegelbestimmungen	61
2.8.3	Allospezifische IgM- und IgG-Blutspiegelbestimmungen	61
2.8.4	Zytotoxizitätstest	62
2.8.5	Gemischte Lymphozytenproliferation (MLR)	62
2.8.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	62
2.9	<u>Statistische Auswertung</u>	63
3.	Ergebnisse	64
3.1	<u>Von der Auswertung ausgeschlossene Tiere</u>	64
3.2	<u>Testung der Inzuchtstämme</u>	64
3.3	<u>Transplantatüberlebenszeiten bei orthotoper Nierentransplantation</u>	65
3.3.1	Syngene Nierentransplantation	65
3.3.2	Allogene Nierentransplantation im akuten Abstoßungsmodell	65
3.3.3	Immunsuppressive Protokolle bei der Nierentransplantation	66

3.4	<u>Transplantatüberlebenszeiten bei heterotoper Herztransplantation</u>	66
3.4.1	Syngene Herztransplantation	66
3.4.2	Allogene Herztransplantation im akuten Abstoßungsmodell	67
3.4.3	Allogene Herztransplantation im akzelerierten Abstoßungsmodell	67
3.4.4	Immunsuppressive Protokolle	68
3.5	<u>Übersicht: Immunsuppressive Protokolle</u>	70
3.6	<u>In vitro Untersuchungen</u>	71
3.6.1	Gesamt IgM- und IgG-Bestimmungen	71
3.6.2	Allospezifische IgM- und IgG-Bestimmungen	75
3.6.3	Zytotoxizitätstest	76
3.6.4	Gemischte Lymphozytenproliferation (MLR)	77
3.6.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	78
4.	Diskussion	79
5.	Zusammenfassung	90
6.	Literaturverzeichnis	91
 <u>Anhang:</u>		
	Danksagung	110
	Erklärung	111
	Lebenslauf	112
	Abdruck der Veröffentlichung	

Abkürzungen:

ACCR	akzeleriertes Herzmodell
ADCC	Antikörper abhängige zelluläre Toxizität
AICD	Automatisch-Implantierbarer-Cardioverter-Defibrillator
ALG	Anti-Lymphozytenglobulin
APC	Antigen präsentierende Zellen
ATG	Anti-Thymozytenglobulin
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
BN	Brown-Norway-Ratte
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CDP	Cytidin-Diphosphat
CMV	Cytomegalie Virus
CsA	Cyclosporin A
dCDP	Deoxy-Cytidin-Diphosphat
dCK	Deoxycytidin-Kinase
dCTP	deoxy-Cytidin-Triphosphat
dfdUMP	Difluorodeoxyuridine-Monophosphat
DKMP	dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporalzirkulation
Ext.	Extinktion
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GvHR	Graft versus Host Reaction

H	experimentelle Gruppe Herz
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen (Oberflächenantigen auf menschlichen Leukozyten)
HSV	Herpes-simplex-Virus
HTX	Herztransplantation
i.v.	intravenös
IABP	Intraaortale Ballonpumpe
IE	internationale Einheiten
IFN	Interferon
IKMP	ischämische Kardiomyopathie
IL	Interleukin
IMP-DH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
inf.	inferior
INT	Tetrazolium Salz
KG	Körpergewicht
KH	Kontrollgruppe Herz
KHK	koronare Herzkrankheit
KN	Kontrollgruppe Niere
LAK	IL-2 aktivierte Killer-Zelle
LBNF ₁	(Lewis x Brown-Norway) F ₁ -Hybrid-Ratte
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LEW	Lewis-Ratte
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction (gemischte Lymphozyten Reaktion)
MW	Mittelwert
N	experimentelle Gruppe Niere
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NTX	Nierentransplantation
NYHA	New York Heart Association
p.o.	post operativ
PCR	Polymerase Chain Reaction

Abkürzungen

PE	Phycoerythrin
RID	Radiale Immun Diffusion
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
sup.	superior
Tbc	Tuberkulose
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tx	Transplantation
UTP	Uridintriphosphat
Vv.	Venae
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Historischer Überblick

1.1.1 Organtransplantation

Die Idee, Gewebe und Organe zu transplantieren und dadurch Menschen zu heilen oder ihre Beschwerden zu lindern, hat Mediziner seit vielen Jahrhunderten fasziniert. Die Geschichte der Organtransplantation wurde maßgeblich von der Entwicklung der Anastomosentechniken, dem Verständnis der immunologischen Grundlagen und der Entdeckung immunsuppressiver Verfahren beeinflusst.

Die ersten Versuche einer Organverpflanzung gehen auf die Anfänge des letzten Jahrhunderts zurück. Aus dieser Zeit sind tierexperimentelle Transplantationen der Niere und des Herzens bekannt:

Nachdem CARELL die Prinzipien der Gefäßnaht entwickelte, führten er 1902 in Lyon und ULLMANN (49) 1902 in Wien als erste autologe, allogene und heterologe Nierentransplantationen an Hunden und Ziegen durch. Dabei konnte CARELL 1906 zeigen, dass ein Hund die allogene Nierentransplantation 10 Tage überlebte (25), wobei es innerhalb der ersten 8 postoperativen Tage zur normalen Urinproduktion gekommen war. 1905 berichteten CARELL und GUTHRIE über die erste erfolgreiche heterotopie Herztransplantation beim Hund. Das Herz schlug ungefähr zwei Stunden (26). In der Folgezeit wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Organtransplantationen zu optimieren. Die Operationstechnik wurde weiterentwickelt (24), und die Kühlung der Transplantate zwischen der Ex- und Implantation wurde eingeführt (126). Auch die heterotopie Transplantation der Niere in den Halsbereich unter Erhaltung der Niere des Empfängertieres (24) wurde erfolgreich durchgeführt.

1923 beschrieb WILLIAMS erstmalig die histologischen Unterschiede zwischen syngen und allogen transplantierten Nieren (182). Er führte die Unterschiede auf biologische Unverträglichkeiten, hervorgerufen durch Blutbestandteile, zurück. In den frühen 30er Jahren postulierten MANN et al., dass nicht nur die chirurgische Technik allein die Dauer des Transplantatüberlebens beeinflussen würde. Vielmehr schrieben sie nach zervikalen Hertztransplantationen beim Hund einem unbekannten biologischen Faktor die begrenzte Überlebenszeit der Organe zu (103). Diese Unterschiede konnten jedoch erst in den frühen 40er Jahren geklärt werden (58).

Die ersten Transplantationsversuche am Menschen reichen ebenfalls bis an den Anfang des letzten Jahrhunderts zurück. JABOULET führte 1906 in Lyon (Spendertiere Schweine und Ziegen) und UNGER 1909 in Berlin (Spendertier Affe) xenogene Transplantationen durch (183). Die Nieren nahmen jedoch ihre Funktion nicht auf (105). 1936 unternahm VORONOV in Kiew den ersten Versuch einer allogenen Nierentransplantation am Menschen mit einer Leichenniere (176). Der Patient verstarb 48 Stunden später. Weitere Nierentransplantationen von LAWLER et al. (96) 1950, HUME et al. (78) und KÜSS et al. (94) 1951, der an der Entwicklung der noch heute praktizierten Methode der heterotopen, extraperitonealen Nierentransplantation beteiligt war, führten zu einer mehrtägigen Transplantatüberlebenszeit, endeten jedoch nach einem Zeitraum von maximal 35 Tagen mit dem Tod der Patienten (94).

Am 23.12.1954 führten MURRAY, HUME, HARRISON und MERRIL an der Harvard Medical School in Boston erstmalig eine langfristig erfolgreiche Übertragung einer Niere von einem Lebendspender auf seinen eineiigen Zwilling Bruder durch (78). In den nachfolgenden Operationen überlebten einige der Transplantatempfänger mehr als 20 Jahre (105). Dieser unerwartete Erfolg wurde teilweise der reduzierten Immunkompetenz des Empfängers zugeschrieben, die durch die chronische Urämie bedingt war (19).

Bis zu dieser Zeit ist nur die Transplantation von Nieren beschrieben worden. Erst 1956 berichtet DEMIKOV (43) über heterop-intrathorakal implantierte Herzen im Tiermodell, wobei diese Organe schon die komplette Aufgabe der Blutzirkulation im Empfängerorganismus übernahmen. 1959 berichteten WEBB und HOWARD über längere Transplantatüberlebenszeiten nach Organperfusion und Hypothermie (179, 180). Im Laufe der Zeit folgten Berichte über Tierexperimente zur Leber (181)- und Pankreastransplantation (98).

Weitere erfolgreiche Organtransplantationen beim Menschen gelangen 1963 für die Leber durch STARZL (158) und für die Lunge durch HARDY (69). 1967 fanden die erste erfolgreiche Pankreastransplantation durch LILLEHEI und KELLY (85) sowie die erste allogene Herztransplantation am Menschen durch BARNARD (7) statt. Eine en-bloc-Transplantation von Herz und Lunge konnte 1981 erstmals durch REITZ (105) durchgeführt werden.

1.1.2 Transplantationsimmunologie

Durch ihre Untersuchungen bei der allogenen Hauttransplantation an Kaninchen in den frühen 40er Jahren legten MEDAWAR und GIBSON die Grundlagen für das immunologische Verständnis der Abstoßungsreaktionen und der Organtoleranz (58,110,111), in dem sie nachwiesen, dass allogene Transplantate eine aktive Immunisierung und damit eine Antikörperbildung im Empfänger provozieren. Sie prägten so den Begriff der Transplantationsimmunologie und hatten vor allem dem humoralen System eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (58,110).

Heute weiß man, dass für die Abstoßungsreaktion der Histokompatibilitätskomplex (MHC, engl.: major histocompatibility complex) verantwortlich ist, dessen Gene die spezifische immunologische Verschiedenheit eines Individuums in Form von Gewebeantigenen, dem HLA-System (engl.: human leucocyte antigen-System), kodieren.

Neben diesem System spielen auch Blutgruppenantigene des ABO-Systems, sowie sogenannte Minor-Histokompatibilitätsantigene (u.a. monozytäre oder vaskuläre Endothelzellantigene) eine Rolle (174).

Die wichtigsten Antigene für die Histokompatibilität (HLA-Antigene), lassen sich nach Struktur, Funktions- und Gewebeverteilung in 2 Klassen unterteilen: Die Antigene der Klasse I sind Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche sämtlicher kernhaltiger Organ- und Blutzellen (bis auf plazentare Trophoblasten) vorhanden sind. MHC-Antigene dieser Klasse entsprechen beim Mensch HLA-A-, -B- und -C-Antigenen und werden vom 6. Chromosom codiert. Antigene der Klasse II sind ebenfalls Glykoproteine, die jedoch hauptsächlich auf immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten vorkommen. Auch sie werden vom 6. Chromosom codiert und entsprechen beim Menschen den HLA-D-Antigenen (-DP, -DQ und -DR). Sie sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Intensität einer Immunantwort und der potentiellen Abstoßungsreaktion (76,168).

Erkennt der Empfängerorganismus nach einer Transplantation ein „fremdes“ HLA-Antigen, welches aus dem Transplantat in den Empfänger gelangt, erfolgt die immunologische Antwort in Form einer Abstoßungsreaktion:

Die Auslösung der zellulären Immunreaktion ist abhängig ist von der Präsentation der inkompatiblen MHC- und Non-MHC-Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Bei der Immunisierung gegen Allotransplantate sind zwei verschiedene Populationen von APC beteiligt, nach denen die Art der Antigenpräsentation in einen direkten und indirekten Weg eingeteilt wird. Bei der *direkten Route* erfolgt die Antigenpräsentation durch gewebeständige APC, die mit dem Transplantat übertragen wurden (passenger leucocytes) und somit *MHC-Moleküle des Spenders* exprimieren. Die *indirekte* Antigenpräsentation geschieht über APC des Empfängers, welche die aus dem Transplantat freigesetzten Antigene phagozytieren und die anfallenden Peptide zusammen mit *eigenen MHC-Molekülen* an der Oberfläche präsentieren (47).

Je nachdem, ob die T-Zellaktivierung über APC des Spenders (direkt) oder des Empfängers (indirekt) erfolgt, treten Unterschiede in der Spezifität der Immunreaktion auf.

Zur vollen Ausprägung zellvermittelter Immunreaktionen kann es nur kommen, wenn die T-Zellen sowohl eine Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex (Signal 1) als auch über kostimulatorische Signalwege (Signal 2) erhalten. Das von den Makrophagen gleichzeitig sezernierte Interleukin 1 (IL-1) dient dabei als Unterstützung. Die Aktivierung der T-Helferzellen führt zu deren Reproduktion und Differenzierung. Dabei kommt es zur vermehrten Ausschüttung von IL-1, IL-2, IL-4, Interferon- γ (IFN- γ) und Bildung des IL-2-Rezeptors auf T-Helferzellen und zytotoxischen Lymphozyten (CD 8). Interleukine greifen vor allem aktivierend und als Botenstoffe in das Abstoßungsgeschehen ein, indem IL-2 und IL-4 die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen stimulieren, die spezifische Antikörper gegen Fremdartigene des Transplantates produzieren.

Somit wird auch eine humorale Immunantwort gegen das Transplantat ausgelöst. Die Antikörper führen entweder zur komplementvermittelten Zell-Lyse im Transplantat oder werden an Makrophagen und natürlichen Killerzellen gebunden. Auf diesem Weg können sie auch eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, engl.: antibody dependent cell cytotoxicity) auslösen. IL-1 bewirkt unter anderem die Freisetzung weiterer Lymphokine und Prostaglandine. IFN- γ steigert die Makrophagenaktivität und die Expression der MHC-I- und MHC-II-Antigene auf den Transplantatzellen (64,100,107,171,174).

Die durch MHC-I-Antigene aktivierten T-Lymphozyten proliferieren zu zytotoxischen T-Zellen und greifen neben aktivierten T-Helferzellen und Makrophagen das Transplantat an (174). Dort kommt es mit der Infiltration der genannten Zellen zum zunehmenden Struktur- und schließlich Funktionsverlust des Organs (155,169,170).

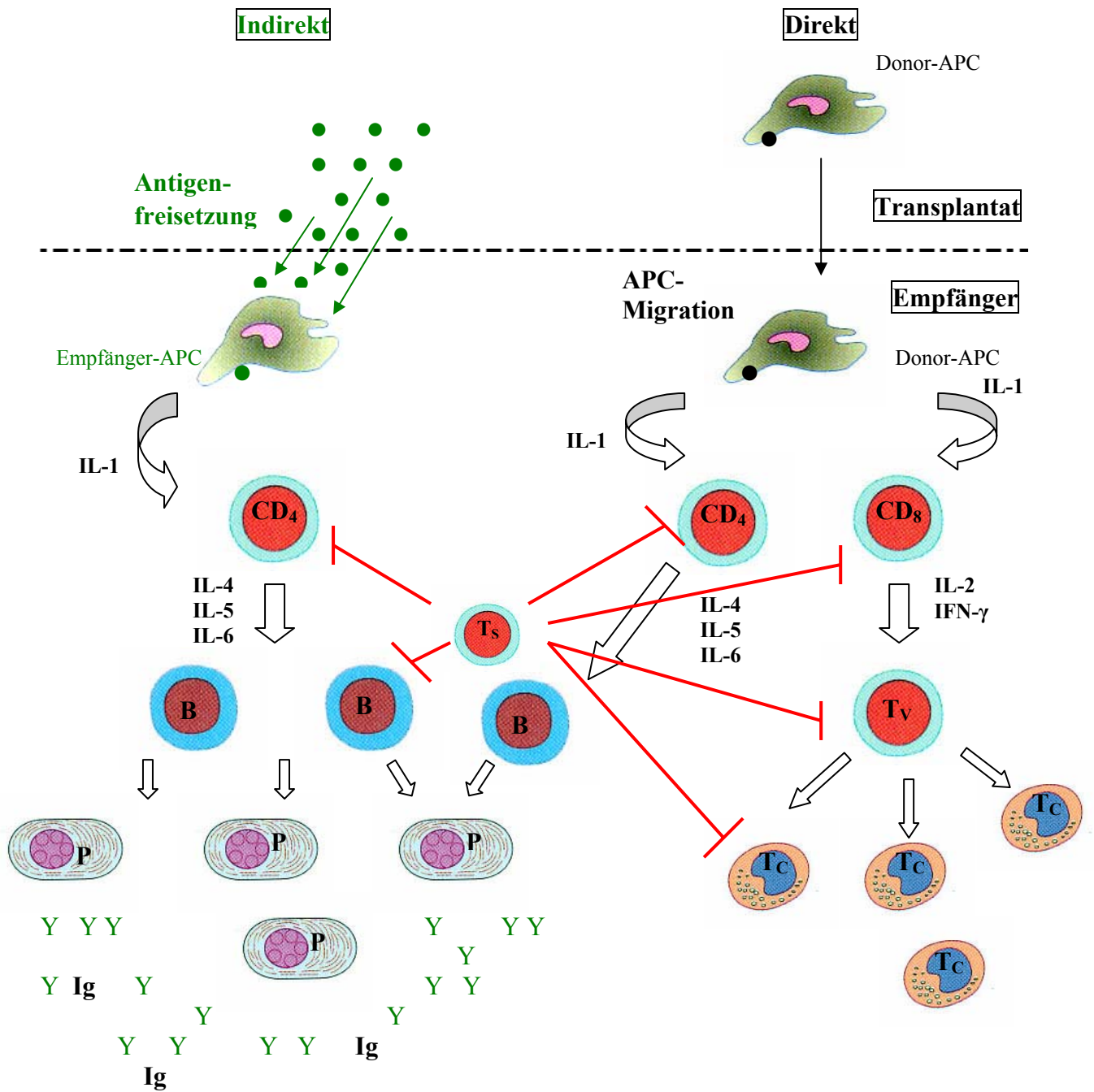


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der direkten und indirekten Aktivierung von T- und B-Lymphozyten nach Antigenpräsentation. APC: Antigen-präsentierende Zelle, CD₄: T-Helfer-Lymphozyten, CD₈: T-Helfer-Lymphozyten, B: B-Lymphozyt, T_S: Suppressor-T-Zelle, T_V: unreife T-Vorläuferzelle, P: Plasmazellen, T_C: zytotoxische T-Lymphozyten, IL: Interleukin (1-6), IFN-γ: Interferon-γ, Ig: Immunglobuline.

Es werden vier Abstoßungsreaktionen unterschieden:

- hyperakute Abstoßung
- akzelerierte Abstoßung
- akute Abstoßung
- chronische Abstoßung

Die *hyperakute Abstoßung* tritt schon innerhalb weniger Minuten nach der Transplantation auf und wird durch präformierte, zytotoxische Antikörper verursacht, die durch Bluttransfusion, Schwangerschaft oder frühere Transplantationen entstanden sein können. Durch routinemäßig durchgeführte „Cross-match-Untersuchungen“, die nach den o.g. Antikörpern fahnden, sind solche Abstoßungen heute selten geworden. Diese Form der Abstoßung tritt allerdings noch bei der Xenotransplantation auf, bei der die Transplantate bereits nach kürzester Zeit zerstört werden (76).

Auch die *akzelerierte Abstoßung* ist antikörpervermittelt. Jedoch reagieren in diesem Fall keine spezifischen Antikörper. Es kommt vielmehr zu einer schnellen Antikörperbildung, welche bei sensibilisierten Patienten durch T-Gedächtniszellen angeregt wird. Die Abstoßung erfolgt hier nach 24 bis 36 Stunden, was eine klare Abgrenzung zur hyperakuten, bzw. akuten Form oft erschwert (76).

Die *akute Abstoßung* ist jederzeit nach einer Transplantation möglich und tritt ohne Immunsuppression regelmäßig auf (außer bei Isotransplantationen). Ihr liegt eine zelluläre Reaktion durch die oben beschriebene T-Zell-Aktivierung zugrunde, und sie wird nach 1 bis 3 Tagen klinisch apparent (76,77). Akute Abstoßungsepisoden nach Organtransplantationen lassen sich heute durch potente Immunsuppressiva behandeln und führen nicht mehr zum Organverlust.

Die *chronische Abstoßungsreaktion* ist die wichtigste Ursache der Organzerstörung im Langzeitverlauf. Sie tritt schleichend nach Monaten bis Jahren auf und führt zum irreversiblen Transplantatverlust.

Gekennzeichnet durch chronische Abläufe des Immunsystems, die sich therapeutisch nicht wesentlich beeinflussen lassen, vereinigt sie humorale und zelluläre Komponenten. Sie manifestiert sich vorwiegend an den vaskulären Strukturen (Arteriolen) (76,77,174).

Bei der sogenannten „Graft-versus-Host-Reaction“ (GvHR) handelt es sich um eine immunologische Abwehrreaktion vom Transplantat gegen den Empfängerorganismus. Das Entstehen einer GvHR ist von mehreren Faktoren abhängig.

Dazu gehören die immunologische Reaktionslage des Empfängers, sowie der Grad der Histoinkompatibilität zwischen Empfänger- und dem Spendergewebe. Auslöser sind mit dem Transplantat übertragene Spenderlymphozyten und –monozyten, sogenannte „passenger leucocytes“, die in Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren eine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Die GvHR kommt hauptsächlich bei Knochenmark-transplantierten Patienten vor, wo sie, trotz Untersuchung der Histokompatibilität („tissue matching“), bei bis zu 50% der Patienten auftritt (118).

1.1.3 Immunsuppression

Seit MEDAWARS Theorie von der, durch eine Immunreaktion ausgelöst, Abstoßung eines Transplantates (110,111), ist die immunsuppressive Therapie in der Transplantationsmedizin nicht mehr wegzudenken. Trotz intensiver Bemühungen in den letzten Jahrzehnten ist es bisher jedoch noch nicht gelungen, den Abstoßungsprozess selektiv zu hemmen und dabei die immunologische Reaktivität gegenüber bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen sowie gegenüber Tumorzellen weitgehend zu erhalten.

Physikalische Immunsuppression durch Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen (44,121) sowie die chirurgische Entfernung von Lymphknoten und lymphatischem Gewebe (55,152,160), spielen in der heutigen Medizin nur noch eine untergeordnete Rolle.

Anders verhält es sich mit der medikamentösen Immunsuppression, welche der unspezifischen Immunsuppression zuzuordnen ist. Ohne diese Form der Suppression wäre die heutige Organtransplantation nicht denkbar.

Einen aktuellen Überblick über die Vielfalt der Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung zeigt Tabelle 1. Die wichtigsten werden anschließend kurz erwähnt.

Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung	
Alkylierende Substanzen	Cyclophosphamid Chlorambucil Busulfan Tretamin u.a.
Antimetabolite	
- Purinantagonisten	Azathioprin 6-Mercaptopurin Mycophenolsäure RS-61443 u.a.
- Pyrimidinantagonisten	5-Fluoruracil 5-Fluordesoxyuridin Bromdesoxyuridin Brequinar Methotrexat Amethopterin u.a.
- Folsäureantagonisten	
Kortikosteroide	Prednison Prednisolon Methylprednisolon
Sexualhormone	Östrogene Gestagene
Enzyme	L-Asparaginase L-Glutaminase
Antibiotika	Aktinomycin C und D Chloramphenicol Tetracycline
Vinca Alcaloide	Vincristin Vinblastin
Antimykotika	Miconazol Metronidazol Griseofulvin u.a.
Antiinflammatorische Substanzen	Azetylsalizylsäure Phenylbutazon Indomethacin Penicillamin u.a.
Biologische Substanzen	Antilymphozytenserum Antithymozytenserum Antimakrophagenserum Monoklonale Antikörper Phythamagglutinin u.a.
Pilzmetabolite	Cyclosporin A, B, G Makrolide: FK 506, Rapamycin
Neuere Immunsuppressiva (chemisch nicht einheitlich)	Brequinar 15-Deoxyspergualin Leflunomid RS-61443
	Urämie
Tabelle enthält keine Wertung hinsichtlich immunsuppressiver Potenz oder therapeutischen Nutzen der Substanzen	

Tab. 1: Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung (Quelle 10,13,167)

Wie aus der Tabelle 1 hervor geht, umfasst das Spektrum der Immunsuppressiva chemisch sehr unterschiedliche Substanzen. Daher ist im Hinblick auf die klinische Anwendung eine Einteilung nach dem Wirkungsmechanismus am zweckmäßigsten.

Um mit einem additiven oder synergistischen Effekt auf das Immunsystem eine Reduzierung des Nebenwirkungsrisikos zu erreichen, werden Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen häufig miteinander kombiniert, Substanzen mit gleichen oder ähnlichen Wirkungsmechanismen in der Regel nicht. Mit diesem Ansatz kann eine ausgeprägte Immunsuppression bei begrenzten toxischen Komplikationen erreicht werden.

Inhibitoren der Cytokinsynthese

Cyclosporin A (CsA, Sandimmun[®], Sandimmun Optoral[®], Neoral[®])

BOREL und Mitarbeiter beschrieben 1976 erstmals diesen Pilz-Metaboliten (15,16), welcher heute ausschließlich aus dem Bodenzpilz *Tolypocladium inflatum Gams* aus Norwegen isoliert wird (17) und durch den sich erstmals die Möglichkeit ergab, mit einem Medikament selektiv die Immunantwort zu unterdrücken, ohne eine generelle Abwehrschwächung auszulösen.

Bereits die erste klinische Anwendung an nierentransplantierten Patienten 1978 (23) hatte völlig neue Perspektiven eröffnet. Operationen, wie die kombinierte Herz-Lungentransplantation wurde durch CsA überhaupt erst möglich (143). Durch seine Verwendung konnten nicht nur die 1-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensraten von Nierentransplantaten um 20-30 % gegenüber der „Vor-Cyclosporin-Ära“ erhöht werden, manche Zentren erreichen gar eine 1-Jahresüberlebensrate von über 90 % (104). Es stellt auch heute noch das wichtigste Immunsuppressivum dar.

Cyclosporin A bindet intrazellulär an das von HANDSCHUMACHER et al. 1984 entdeckte Rezeptorprotein Cyclophilin, eine Prolin-Isomerase. Erst durch die Bindung dieses Enzyms und anschließender Bindung/Inhibition der Phosphatase Calcineurin kann Cyclosporin A in die intrazelluläre Reaktionskaskade zur T-Zell-Aktivierung eingreifen und diese blockieren (157).

Auf diesem Wege kommt es zur Hemmung der Interleukin 1-, Interleukin 2- und Gamma-Interferon-Synthese (114,142) sowie zur Stimulation von Transforming Growth Factor beta (TGF- β) (86), so dass eine Proliferation von T-Helfer-Lymphozyten und -lymphokinunabhängig - von zytotoxischen T-Zellen (87) ausbleibt. Gleichzeitig wird die Bildung einer spezifischen T-Suppressor-Zell-Subpopulation gefördert (65,73,79,93,154).

Weltweit als Basismedikament etabliert, wird es in der Regel in Kombination mit Glukokortikoiden und/oder Azathioprin bzw. antilymphozytären Antikörpern eingesetzt (10). Vor allem in Kombination mit den Glukokortikoiden addieren sich die immunsuppressiven Effekte beider Substanzen, wodurch die Glukokortikoid-Dosis und damit verbunden die durch die Steroide hervorgerufenen Nebenwirkungen (s.u.) reduziert werden können (2,17,104). Vor allem die Nephrotoxizität, die durch tubuläre Schädigung zum Nierenversagen führen kann, die interstitielle Fibrose sowie die Tonuserhöhung im Vas afferens mit konsekutiver Senkung der glomerulären Filtrationsrate (8,82,95,167,185) sind besonders hervorzuhebende Nebenwirkungen. Weitere sind Hypertonie, Gingivahyperplasie, Hirsutismus, Lymphomentstehung sowie Hepato- und Neurotoxizität.

FK 506 (Tacrolimus; Prograf®)

1984 entdeckt, gleicht die Wirkung dieses Makrolid-Antibiotikums sehr der von Cyclosporin A. Auch hier erfolgt eine Bindung an einen zytoplasmatischen Rezeptor, das FK-binding protein (FK-bP), wodurch anschließend die Phosphatase Calcineurin und damit indirekt die Produktion von Zytokinen gehemmt wird (151). Es besitzt bei gleicher applizierter Menge eine zehn- bis hundertmal höhere immunsuppressive Wirkung als Cyclosporin A, die aber nicht mit einer wesentlich erhöhten therapeutischen Breite verbunden ist (168,184). In verschiedenen kontrollierten Studien hat sich gezeigt, dass die Anzahl der akuten und Kortikoid-resistenten Abstoßungen bei Patienten, die mit Tacrolimus behandelt wurden, signifikant geringer war als bei Cyclosporinbehandlung (109,135,166). Bei beiden Patientengruppen waren das Transplantatüberleben sowie die 1-Jahres-Überlebensrate allerdings gleich (27).

Tacrolimus weist mit Cyclosporin A ein weitgehend überlappendes Spektrum von Nebenwirkungen auf. Die wichtigsten sind Neurotoxizität (52) und Nephrotoxizität (42), arterielle Hypertonie, gastrointestinale Beschwerden, Anämie und ein diabetogener Effekt (42,52,95,128).

In Kombination mit Azathioprin oder Mycophenolat und Prednison wird es in vielen Zentren als Basisimmunsuppressivum eingesetzt. Ebenfalls kommt es als „Rescue-Medikament“ bei steroidresistenter, schwerer Abstoßung unter Cyclosporin-A-Therapie zum Einsatz (95).

Inhibitoren der Cytokinwirkung

Rapamycin (Sirolimus; Rapamune®)

Ebenfalls als Makrolid-Antibiotikum bekannt, wurde es in den 70er Jahren ursprünglich als Fungistatikum eingesetzt (115). Anders als CsA und FK 506 wirkt Rapamycin zu einem späteren Zeitpunkt im Zellzyklus und blockiert den Übergang aktivierter Zellen in die S-Phase (50). Sirolimus supprimiert *in vivo* und *in vitro* die Signaltransduktionsvorgänge, worauf die immunsuppressive Wirksamkeit zurückzuführen ist (21,50). Da es einen Synergismus mit Tacrolimus und Cyclosporin A aufweist, kann durch Dosisreduktion der beiden o.g. Immunsuppressiva wahrscheinlich die Toxizität dieser Substanzen reduziert werden.

An Nebenwirkungen sind die Knochenmarksdepression mit ausgeprägter Thrombozytopenie, gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Völlegefühl) und Kopfschmerzen bis hin zur Migräne (132) zu nennen.

Leflunomid

Dieses neue Immunsuppressivum wirkt ebenfalls selektiv, indem es die T- und B-Zell-Proliferation stark hemmt, ohne jedoch die Ausbildung des IL 2-Rezeptors zu beeinträchtigen (29). Im Tierexperiment hat es sich als stark immunsuppressiv erwiesen (149).

Kortikosteroide

Glukokortikoide (Prednisolon; Decortin[®], Methylprednisolon; Urbason[®])

Glukokortikoide sind seit den Beobachtungen von BILLINGHAM et al. im Jahre 1951 für ihre immunsuppressive Wirkung bekannt (13). Neben den allgemeinen, anti-inflammatorischen Wirkungen durch Membranstabilisierung und Hemmung der Prostaglandinsynthese macht man heute die Inhibition der Gen-Expression für die Zytokine IL-1, IL-2 und IL-6, Interferon- γ sowie TNF- α für den immunsuppressiven Effekt verantwortlich (10,57,165).

Eingesetzt werden Glukokortikoide heute vor allem in Kombination mit Azathioprin, während sie im Rahmen der „Dreifachtherapie“ mit Azathioprin und Cyclosporin A (20,74) nicht mehr obligat sind (Ausnahme: progrediente chronische Abstoßung) (95). Ebenfalls finden sie als Therapie der Wahl im Rahmen akuter Abstoßungskrisen (95,159,162) ihre Anwendung.

Nebenwirkungen bei Glukokortikoid-Dauertherapie, bzw. Hochdosisschemata sind unter anderem: Cushingoider Habitus, Adipositas, Steroid-Diabetes, gastrointestinale Ulzera, aseptische Knochennekrosen, Infektionsanfälligkeit (Zytomegalievirus-, Pneumocystis-carinii-, Tuberkulose- und Pilzinfektionen), Psychosen, Wundheilungsstörung und bei Kindern Wachstumsretardierung (10,57,167).

Antimetabolite (Proliferationshemmung)

Azathioprin (Imurek[®], Imuran[®])

Die klinische Einführung dieses Imidazolabkömmlings des 6-Mercaptopurins Anfang der 60-er Jahre durch MURRAY (120) führte zu den ersten dauerhaft erfolgreichen Organtransplantationen weltweit (20). Azathioprin wird in der Leber zu 6-Mercaptopurin verstoffwechselt und führt als Purinantagonist zur Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese (2), wodurch es zur Störung der Lymphozytenproliferation kommt (10).

Azathioprin wird vorwiegend in der Basistherapie mit Glukokortikoiden oder Cyclosporin A eingesetzt (18,150).

Die sogenannte „Dreifachtherapie“ von Azathioprin, Cyclosporin A und Prednison (10,18,20) ist heutzutage nur bei Transplantationen mit hohem immunologischen Risiko, bei chronischer Abstoßung oder bei chronischer Cyclosporin A-Nephrotoxizität indiziert (95).

An Nebenwirkungen sind vor allem die Hepatotoxizität und die Myelosuppression mit Leuko- und Thrombozytopenie zu nennen (25,57,96). Es ist mutagen und kann zu Chromosomenbrüchen führen (95).

Mycophenolat Mofetil (MMF; CellCept®)

Dieser selektive, nicht kompetitiv reversible Inhibitor der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMP-DH) hemmt durch seinen Wirkmechanismus die de-novo-Biosynthese von Purinen (168). Da die Purin-Biosynthese vor allem in proliferierenden B- und T-Lymphozyten von der IMP-DH abhängt, und andere Zellen zusätzlich einen „salvage pathway“ besitzen, der sie von der de-novo-Synthese von Guanotin-Nukleotiden weitgehend unabhängig macht, ist diese Hemmung selektiver als die von Azathioprin.

Als Zusatz von Cyclosporin A in der Rejektionstherapie lieferte es in den ersten klinischen Tests gute Ergebnisse (168) und wird seitdem als Immunsuppressivum in Kombination mit Cyclosporin A oder Tacrolimus und Prednison in der Transplantationschirurgie eingesetzt (95,149).

Während Nephro- und Hepatotoxizität nicht zu beobachten waren (136), sind gastrointestinale Beschwerden und Leukopenien (20,57) bekannte Nebenwirkungen.

Brequinar

Mit ähnlicher immunsuppressiver Aktivität wie Mycophenolat Mofetil kann dieser Pyrimidinsäureinhibitor in tierexperimentellen Versuchen wirksam die Abstoßung allogener transplanterter Organe verhindern. Neben gastrointestinalen Nebenwirkungen führt er zur Knochenmarksdepression (38,61). Brequinar befindet sich noch in der experimentellen Erprobung (38,61,95,149).

Antilymphozytäre Antikörper

Anti-Lymphozytenglobulin (ALG) / Anti-Thymozytenglobulin (ATG; Atgam[®], Thymoglobulin[®])

STARZL et al. gelang 1967 eine weitere Verbesserung der immunsuppressiven Therapie durch den klinischen Einsatz von Anti-Lymphozytenglobulin (161). Als relativ unspezifische, polyklonale Antikörper gegen lymphozytäre Antigene, welche aus Pferden oder Kaninchen durch Injektion humaner Lymphozyten gewonnen werden, reagieren sie unmittelbar nach intravenöser Applikation mit allen Lymphozyten. Innerhalb von Minuten werden so vor allem die reifen T-Zellen aus der Zirkulation entfernt, wodurch sich besonders akute Abstoßungsreaktionen wirksam bekämpfen lassen (33,127).

Unerwünschte Wirkungen können anaphylaktische Reaktionen, Thrombozyto-, Granulozyto- und Lymphopenie sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit sein. Insbesondere bei wiederholter Anwendung kann es zu heftigen Nebenwirkungen in Form der Serumkrankheit kommen, da es sich hierbei um tierisches Eiweiß handelt, so dass die Anwendungsmöglichkeiten beschränkt bleiben (33,95,108,127).

Bei Patienten mit hohem immunologischen Abstoßungsrisiko ist die prophylaktische Behandlung mit ATG in den ersten Tagen nach einer Transplantation empfehlenswert. Antilymphozytäre Antikörper kommen zusätzlich im Rahmen von steroidresistenten Abstoßungskrisen zum Einsatz (18,122).

Anti-CD 3-Antikörper (OKT 3; Orthoclone[®])

Dieser erste zugelassene monoklonale Antikörper wurde Anfang der 80-er Jahre ausführlich von COSIMI et al. beschrieben (36,37). Er richtet sich spezifisch gegen den T-Zellrezeptor/CD 3-Molekülkomplex und verhindert damit nicht nur die T-Zellaktivierung, sondern bewirkt so auch eine Depletion humaner, reifer T-Zellen (mit OKT 3 markierte T-Zellen werden vom retikuloendothelialen System aus der Zirkulation entfernt). Nach einmaliger Gabe können bis zu 99% aller T-Lymphozyten aus dem Blut eliminiert werden (122).

OKT 3 wird heute hauptsächlich in der steroidresistenten Abstoßungstherapie und von einigen Zentren auch in der Induktionstherapie bei sensibilisierten Empfängern eingesetzt (10,57,123,163,175,185).

Nebenwirkungen zu Beginn der Therapie sind durch die sogenannte „first-dose-reaction“ bedingt, bei der es durch eine plötzliche Lymphokinfreisetzung (cytokine release syndrom: TNF- α , IL-2, Interferon- γ) zu starken Unverträglichkeitsreaktionen wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Blutdruckabfall, Kopfschmerzen, aseptische Meningitiden und Lungenödem kommen kann (10,18,167). Ein weiteres Problem besteht in der, durch das murine Eiweiß ausgelösten, Induktion spezifischer Antikörper gegen OKT 3, was eine wiederholte Anwendung erschwert (36,37,163). In der Literatur werden sekundären Neoplasien durch hohe OKT 3-Dosen beschrieben (175).

Interleukin-2-Antikörper (Simulect[®], Zenapax[®])

Diese Antikörper reagieren nur mit Lymphozyten, die das Interleukin-2-Rezeptor-Molekül nach vorheriger Aktivierung exprimieren (132). Die Immunantwort kann somit sehr spezifisch unterdrückt werden. Die Antikörper gibt es in chimärer, muriner oder humanisierter Form (95). Um die Bildung von neutralisierenden Antikörpern, wie es bei Basiliximab (= Simulect[®], murine, monoklonale Antikörper) in 1-3% der Fälle vorkommt, zu verhindern, wird versucht, humanisierte monoklonale Antikörper (Daclizumab, Zenapax[®]) einzusetzen. Einige Studien zeigen, dass die Gabe von IL-2 –Antikörpern zu einer Verringerung der akuten Abstoßungsreaktionen führt, eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit konnte dagegen nicht erreicht werden (18).

Präparatspezifische Nebenwirkungen sind nicht bekannt (95). Die Interleukin-2-Antikörper sind zur Zeit zur Induktionstherapie im Rahmen der Leber-, Lungen- und Nierentransplantation zugelassen (132). Neuerdings kommen sie auch in der immunsuppressiven Therapie nach Inselzell-Transplantation zum Einsatz.

Die klinische Einteilung der immunsuppressiven Therapie erfolgt in drei Formen:

- Induktionstherapie
- Basistherapie
- Abstoßungstherapie

Die *Induktionstherapie* beschränkt sich in der Regel auf die ersten ein bis zwei Wochen posttransplantationem. Sie soll vor allem die Inaktivierung des Immunsystems unmittelbar perioperativ bewirken. Die Dosierungen während dieser Phase sind deutlich höher als in der Basistherapie. Ein weiteres Ziel dieser Therapieform besteht in der Ausschaltung der, durch Cyclosporin A oder Tacrolimus bedingten, Nephrotoxizität in der vulnerablen postoperativen Phase bei der Nierentransplantation. Hier kommt neben Glukokortikoiden und Mycophenolat Mofetil häufig IL-2-Antikörper zum Einsatz.

Die *Basistherapie* beinhaltet heute in der Regel die Dreifachtherapie mit Cyclosporin A, Glukokortikoiden und zunehmend Mycophenolat Mofetil. Dabei werden die einzelnen Medikamente in möglichst niedrigen Dosierungen eingesetzt. Der Vorteil dieser Therapieform besteht in der Minimierung der individuellen Nebenwirkungen bei Potenzierung der Hauptwirkung.

Die *Therapie der Abstoßung* besteht aus der Fortführung der Basisimmunsuppression und hochdosierten Gaben von Glukokortikoiden. Gelingt es dadurch nicht, die Rejektion zu beenden (steroidrefraktäre Abstoßung), müssen potentere Immunsuppressiva, wie z.B. ATG/ALG oder OKT 3 eingesetzt werden. Welches Ausmaß der Immunsuppression angestrebt wird, hängt vom individuellen Verlauf und von der Art der Transplantation ab. Grundsätzlich gilt, dass nach einer Nierentransplantation heute kein Risiko durch die Immunsuppression in Kauf genommen werden sollte, da diese Patienten bei Transplantatverlust wieder dialysiert werden können. Daher wird hier bei unkomplizierten Verlauf meist nur eine Zweierkombination angestrebt.

Im Gegensatz hierzu ist bei der Transplantation von Herz, Lunge oder Leber das Überlebensrisiko des Patienten unmittelbar von der Funktion des Transplantats abhängig, so dass in der Regel ein wesentlich höheres Risiko eingegangen werden kann. In Einzelfällen wird sogar eine Vierfachkombination in der Erhaltungsphase gewählt.

Bei allen Formen der Organtransplantation nimmt das Risiko, eine akute Transplantatabstoßung zu entwickeln, im Langzeitverlauf ab. Damit ergibt sich die Möglichkeit, im späteren Verlauf die Immunsuppression zu reduzieren.

Dies geschieht in der Regel durch Herabsetzung der Steroiddosierung in einen sehr niedrigen Bereich und Anstreben von Cyclosporinspiegeln an der Untergrenze des therapeutischen Fensters. Allerdings muss auch hier der individuelle Verlauf des einzelnen Patienten berücksichtigt werden.

1.1.4 Gemcitabin (2', 2'- difluorodeoxycytidine, dFdC, Gemzar[®])

Gemcitabin wurde Ende der 80-er Jahre in der onkologischen Forschung von Eli-Lilly Ltd. entwickelt (84) und gehört als Pyrimidine-Antimetabolit zur Gruppe der Nukleosid-Analoga. Als Zytostatikum klinisch breit untersucht (39,84,138) wirkt es gegen eine Vielzahl von soliden Tumoren, wie Pankreaskarzinom, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Blasenkarzinom, metastasierendes Mammakarzinom und Ovarialkarzinom (39,84,101).

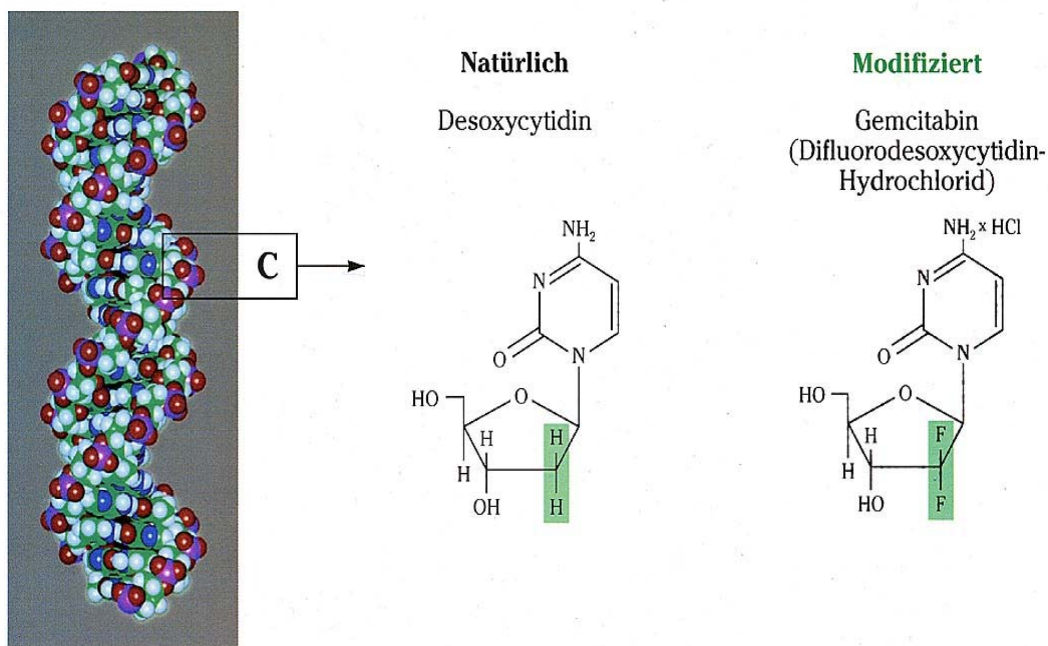


Abb. 2: Gemcitabin-Strukturformel

Als Deoxycytidin-Analogon unterscheidet sich Gemcitabin vom Originalnukleosid durch zwei Fluoratome im Zuckerteil des Moleküls (84,138).

2',2'- Diflourodeoxycytidin ist ein „Pro-Drug“ und wird erst an seinem Zielort – in der Zelle - zur zytotoxischen Substanz aktiviert. Hierzu wird es nach der Aufnahme in die Zelle durch ein spezifisches Enzym, die Deoxycytidin-Kinase (dCK), mehrfach phosphoryliert und als Gemcitabin-Triphosphat anstelle des Deoxycytidin-Triphosphat in die DNA eingebaut, wodurch die Kettenbildung abbricht (masked chain termination), was zur Apoptose führt (138).

Die Besonderheit an Gemcitabin ist die Tatsache, dass der Einbau „maskiert“ verläuft. Das heißt, dass vor dem endgültigen Kettenabbruch ein weiteres Nukleotid eingebaut wird, so dass die Reparaturenzyme (Exonukleasen) anschließend Gemcitabin nicht mehr erkennen können (1,138).

Der selbstpotenzierende Wirkmechanismus des Gemcitabins führt zu einer vermehrten Bildung von Gemcitabin-Bi- und Triphosphat, zu einer verminderten Bildung des Cytidin-Triphosphat sowie zu einer verringerten Elimination von Gemcitabin (1,84,106,138).

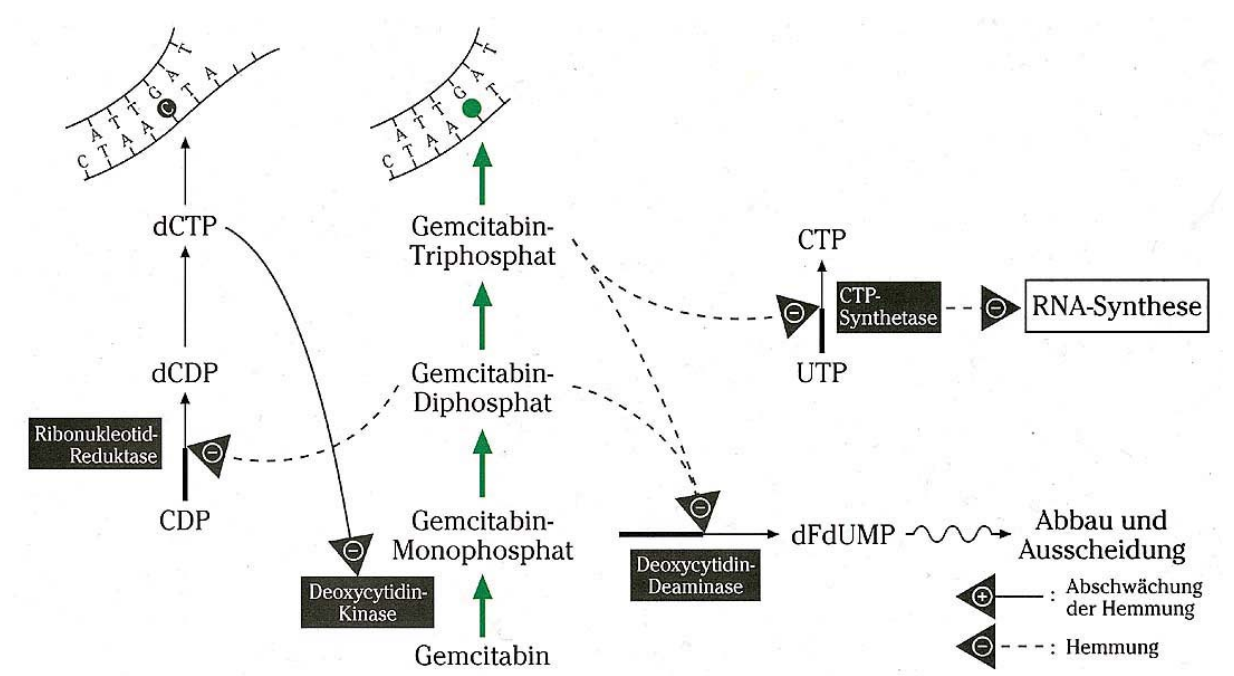


Abb. 3: Selbstpotenzierender Wirkmechanismus des Gemcitabins

Gemcitabin-Diphosphat hemmt die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase, wodurch der Deoxy-Citidin-Triphosphat (dCTP) –Spiegel gesenkt wird. Da dCTP inhibierend auf die Deoxycytidin-Kinase wirkt, welche das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die Phosphorylierung des Gemcitabins darstellt, wird diese Hemmung vermindert. Durch die erhöhte Aktivität der Deoxycytidin-Kinase wird somit vermehrt Gemcitabin in die Di- und Tri-Phosphat-Form umgewandelt. Gemcitabin-Triphosphat hemmt wiederum die CTP-Synthetase, wodurch es zu einer verminderten zellulären CTP und dCTP-Synthese kommt. Dies führt zu einer Inhibition der RNA-Synthese (138).

Gemcitabin-Di- und –Triphosphat hemmen direkt die dCTP-vermittelte Aktivierung der Deoxycytidin-Deaminase wodurch der Abbau und die Ausscheidung von Gemcitabin verringert werden (138).

Nebenwirkungen

Gemcitabin wird im Allgemeinen sehr gut toleriert (84). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Abgeschlagenheit, milde grippe-ähnliche Symptome und reversibler Hautausschlag (39,84). Schwere Formen (WHO Grad III + IV) von Übelkeit und Erbrechen treten nur sehr selten auf (60), so dass eine antiemetische Begleittherapie in der Regel nicht erforderlich ist. Eine ausgeprägte Alopezie wird äußerst selten beobachtet (84).

Mehrere Studien berichten nur in wenigen Fällen über grobe Blutbildveränderung im Sinne WHO-Grad III und IV. GREEN (60) zeigte in seiner Arbeit von 1996 eine Neutropenie bei 24,4 % sowie eine Leukopenie bei 8,6 % der Patienten. Erniedrigte Hämoglobin-Werte waren bei 7,3 %, eine Thrombozytopenie bei 4,7 % nachweisbar. Zu schweren Infektionen im Rahmen der Gemcitabin-Behandlung kam es nur in 1,1% der Fälle. Über ähnliche Ergebnisse berichtet auch KAYE 1994 (84).

Ein Anstieg der Leberenzyme kann vereinzelt vorkommen. In der o.g. Untersuchung von GREEN (60) fand sich eine Erhöhung (WHO-Grad III und IV) der GPT in 9,2%, der GOT in 7,1%, der alkalischen Phosphatase in 6,6% und des Bilirubins in 1,5% der Fälle.

Eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion ist selten nachweisbar (106). Eine Übersicht über die häufigsten Nebenwirkungen im Rahmen einer Gemcitabin-Therapie zeigt Abb. 4.

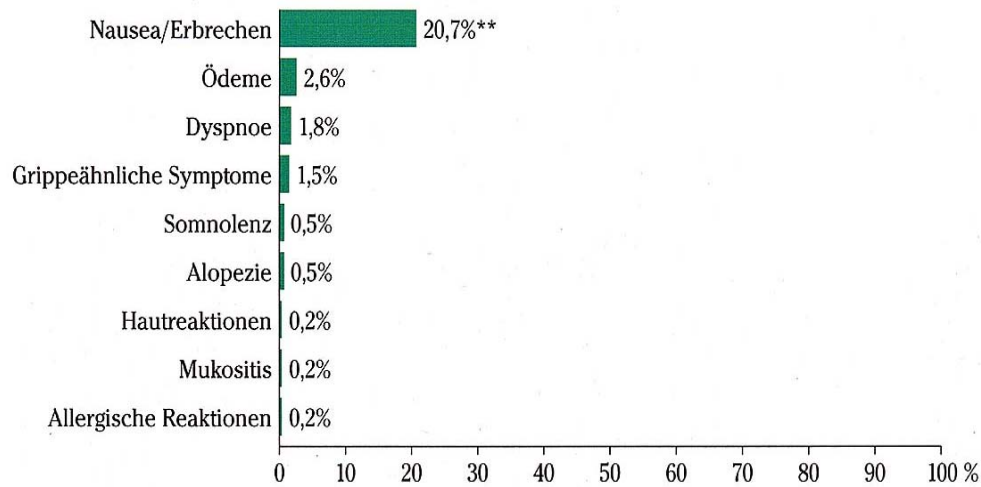


Abb. 4: Häufigste Nebenwirkungen von Gemcitabin (WHO toxicity grade III + IV), nach GREEN et al. (60)

Pharmakokinetische Daten

Gemcitabin wird beim Menschen in einer Dosierung von 1000 mg/m^2 appliziert. Die maximale Plasmakonzentration beträgt dabei 10 bis 40 mg/ml . Als Difluorodeoxyuridine (dFdU) wird Gemcitabin bis zu 98 % abgebaut und als zytostatisch unwirksamer Metabolit renal eliminiert. Weniger als 10 % werden unverändert im Harn ausgeschieden (1,71,138).

Die Plasmahalbwertszeit beträgt bis zu 26 Minuten, die intrazelluläre Halbwertszeit liegt zwischen 5 und 19 Stunden. Die Plasmaproteinbindung ist sehr gering (1,138).

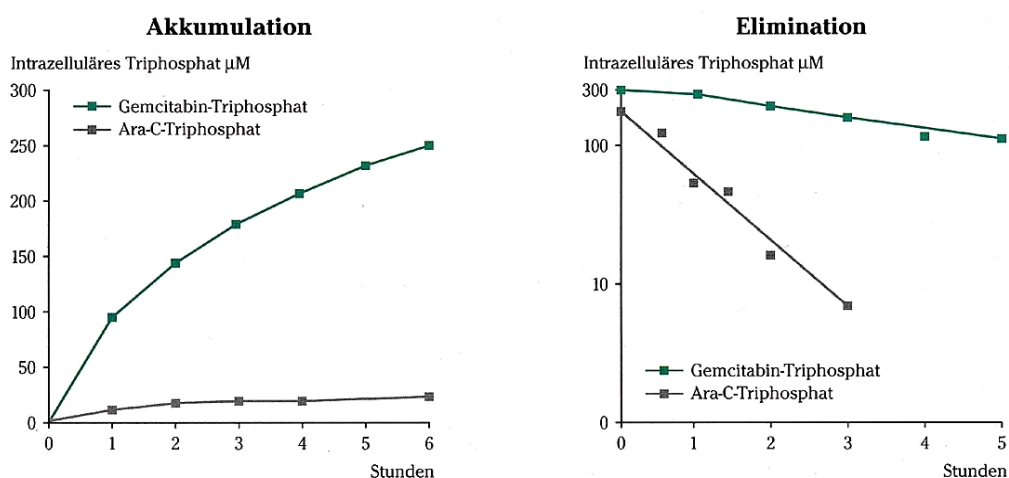


Abb. 5: Pharmakokinetik, nach HEINEMANN et al. (71)

Gemcitabin in der Transplantationsimmunologie

In der Transplantationsmedizin wurde die Wirkung von Gemcitabin auf immunkompetente Zellen bei täglicher low dose Applikation erstmals 1999 von MARGREITER et al. untersucht (106).

Nach einer nachgewiesenen, ausgeprägten Suppression aktivierter T-Lymphozyten in der *in vitro* Untersuchung mit Hilfe des Proliferationstestes (106), wurde die immunsuppressive Wirkung anschließend im Herz-Transplantationsmodell an der Ratte evaluiert. Hierzu wurde den Tieren – je nach zugehöriger Gruppe - nach der Transplantation eine Gemcitabin- Dosis von 25 µg – 6000 µg/kg KG täglich appliziert. Die besten Transplantatüberlebenszeiten resultierten aus den Gruppen mit einer Gemcitabin-Behandlung zwischen 100 – 125 µg/kg KG/d.

Die tägliche Applikation eines anderen Nukleosid-Analogons, welches ebenfalls durch die Deoxycytidin-Kinase aktiviert wird (Cladribin), zeigte nur in Verbindung mit Cyclosporin ähnliche Ergebnisse, während die alleinige Gabe nicht zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führte (106). Die stärkere immunsuppressive Potenz des Gemcitabins im Vergleich zu Cladribin spiegelt sich auch in den Ergebnissen anderer *in vitro* Untersuchungen wider (131). Der Grund hierfür wurde im unterschiedlichen Abbau beider Substanzen sowie in der selbstpotenzierenden Fähigkeit des Gemcitabins gesehen (106).

1.2 Nierentransplantation beim Menschen

1.2.1 Indikationen und Kontraindikationen der Nierentransplantation

Jedes terminale, irreversible Nierenversagen stellt prinzipiell eine Indikation zur Nierentransplantation dar (130). Anders als bei der terminalen Leber- und Herzinsuffizienz, wo es keine Alternativverfahren gibt, steht bei der terminalen Niereninsuffizienz in der Regel die Möglichkeit der Dialyse zur Verfügung. Hierbei können entweder die Hämodialyse oder die Peritonealdialyse (CAPD, engl.: continuous ambulatory peritoneal dialysis) angewandt werden. Da diese Verfahren in der Regel für den Patienten mit deutlichen Einschränkungen der Lebensqualität und erheblichen gesundheitlichen Risiken einhergehen (112), sollte die Nierentransplantation heute bei einer Operationsletalität unter 1% und sehr guten Langzeitergebnisse als Therapie der Wahl angestrebt werden.

Glomerulonephritiden, interstitielle Nephritiden und chronische Pyelonephritiden führen häufig zur Nierentransplantation. Weitere, seltene Indikationen liegen bei vaskulären Erkrankungen, Zystennieren, immunologischen Erkrankungen (z.B. Lupus erythematoses), Amyloidose, Oxalose, kongenitalen Veränderungen, sowie schmerzmittelinduzierten Nephropathien vor (112).

Dringliche Indikationen stellen Shunt-Probleme, schwere renale Osteopathie, progrediente Polyneuropathie, zunehmende Enzephalopathie und schwere psycho-soziale Probleme mit erhöhter Suizidalität dar. Bei Kindern ist die Transplantationsindikation wesentlich dringlicher als bei Erwachsenen, da renaler Minderwuchs und Dystrophie nur unzureichend durch die Dialyseverfahren behandelt werden können.

Relative Kontraindikationen bilden allgemeine Risikofaktoren wie kardio- und zerebrovaskuläre sowie pulmonale Begleiterkrankungen. Absolute Kontraindikationen stellen unter anderem akute und chronische Infektionen (HIV, Tuberkulose, Hep C), Malignome, vaskuläre Systemerkrankungen, generalisierte Amyloidose, hämolytisch-urämisches Syndrom und Drogenabusus dar (130,134).

1.2.2 Operationsverfahren

Bevor es zur Transplantation kommt, werden die Spenderorgane in Deutschland durch Eurotransplant in Leiden (Niederlande) nach den Kriterien Histokompatibilität, Dringlichkeit und Wartezeit des Empfängers verteilt (Allokation). Darüber hinaus werden Immunisierungsstatus und Alter des Rezipienten berücksichtigt.

Die Nierentransplantation lässt sich in drei Abschnitte gliedern:

1. Organspende
2. Organkonservierung
3. Organimplantation

1. Organspende

Bevor ein Organ gespendet werden kann, muss darauf geachtet werden, dass eine ausreichende Funktion des Organs gewährleistet ist. Funktionsparameter sind eine adäquate Diurese, ein Serumkreatininwert unter 2 mg/dl sowie der Ausschluss renaler Erkrankungen in der Vorgeschichte. Ausschlusskriterien für eine Organspende sind floride infektiöse Erkrankungen (Tbc, Lues, HIV), eine Sepsis, Malignomverdacht (Ausnahme: primäre Hirntumoren), chronische Erkrankungen der zu transplantierenden Organe und eine Verbrauchskoagulopathie.

Transplantatnieren werden entweder einzeln von einem Lebendspender (meist Verwandtenspende), oder beidseitig im Rahmen einer Leichenspende entnommen. Für die Leichenspende ist die zweifelsfreie Feststellung des „endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms“ (Hirntod) Grundvoraussetzung (§3, Abs.2 Transplantationsgesetz) (172).

Bei der Organentnahme muss darauf geachtet werden, dass die Organintegrität erhalten und eine kurze Ischämiezeit eingehalten wird. Der Ureter sollte in seiner Länge belassen und seine Blutversorgung erhalten werden. Gleichzeitig sollten anatomische Normvarianten erkannt und bei der Explantation berücksichtigt und dokumentiert werden (9).

Bei einer Leichenspende werden die Nieren, nach einer Heparinisierung, in-situ über einen Katheter in der kaudalen Aorta abdominalis mit Abfluss über die Vena Cava inferior perfundiert, während bei Lebendspendern die Perfusion erst unmittelbar nach der Nephrektomie ex-situ erfolgt (9,130).

2. Organkonservierung

Jede Ischämie führt zwangsweise zum Zell- und Organuntergang. Um die Dauer der tolerablen, kalten Ischämiezeit (Zeitspanne zwischen der Organ-Ex- und -Implantation) möglichst lange gestalten zu können, ist es wichtig, eine ausreichende Organkonservierung zu erzielen. Schon CARRELL (24), CALNE (22), BELZER (11) und COLLINS (32) erkannten dazu die Notwendigkeit einer Kühlung und Perfusion. Noch heute sind dies die Hauptprinzipien der Konservierung (48). Mit der Spülung des Transplantats mit einer gekühlten Flüssigkeit soll das Organ möglichst schnell auf die gewünschte Lagerungstemperatur gebracht und ein gründliches Freispülen der Gefäße von Spenderblut erzielt werden.

Man unterscheidet die maschinelle von der Schwerkraftorganperfusion. Bei der maschinellen Dauerperfusion wird das Organ pulsatil oder kontinuierlich vom gekühlten Perfusat durchströmt. Die Vorteile liegen in den wesentlich längeren Konservierungszeiten (bis 8 Tage). Da diese Methode aber mit einem erheblichen technischem Aufwand verbunden ist, konnte sie sich auf Dauer nicht durchsetzen. Die weitaus gebräuchlichere Methode ist die Flush-Perfusion mit Konservierungslösung per Schwerkraft mit anschließender hypothermer Lagerung durch Oberflächenkühlung. Das Organ wird dabei in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen bei + 4° C aufbewahrt. Diese Methode hat sich bei den Transplantaten ohne gravierende Ischämieschäden bewährt und stellt das derzeit übliche Verfahren für die klinische Organgewinnung dar (9, 129).

Neben der thermischen Kühlung besteht ein weiteres Prinzip der Organperfusion im Zuführen wichtiger Substrate, um den schädigenden Vorgängen während der Ischämie und Hypothermie entgegen zu wirken. Dazu zählt die Erhaltung eines physiologischen pH-Wertes, Verhinderung eines Zellödems durch Beigabe osmotisch und homöostatisch wirksamer Substanzen, sowie die Zuführung energiereicher Substrate, um den Reststoffwechsel energetisch zu unterstützen (12).

Die 1969 von COLLINS et al. entwickelte Euro-Collins-Lösung wurde bis in die achtziger Jahre als gängigste Perfusionslösung in der Nierentransplantation eingesetzt (83,129). Mittlerweile wurde diese Lösung weitgehend durch die UW (University of Wisconsin)-Lösung nach BELZER oder die HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat)-Lösung nach BRETTSCHEIDER verdrängt. Durch den Einsatz dieser „neueren“ Lösungen konnte erstmals eine Nierenkonservierung über 72h erzielt werden (137).

3. Organimplantation

Im standardisierten Nierentransplantationsverfahren werden die Nieren heterotop, extraperitoneal in die kontralaterale Fossa iliaca implantiert. In manchen Fällen wird auch die ipsilaterale Platzierung gewählt, bei Kindern wird aufgrund der großen Spenderniere eine intraperitoneale Implantation favorisiert. Die Spendergefäße werden mit der A. und V. iliaca externa des Empfängers anastomosiert (in der Regel End-zu-Seit). Während der Anastomosierung erhält der Empfänger bereits einen i.v. Bolus von Methyl-Prednisolon sowie ein Diuretikum (130,139).

Der Harnleiter wird zur Verhinderung eines Refluxes nach einer ventralen Zystotomie durch einen submukösen Tunnel in der Blasenwand (OP nach Leadbetter-Politano) geführt und am Blasendach vom Lumen aus adaptiert (51). Die empfangereigene Niere sollte bei infizierten Zystennieren, therapierefraktärer Hypertonie sowie schwerem vesikoureteralen Reflux entfernt werden.

Komplikationen intra- und postoperativ sind, abgesehen von immunologischen Reaktionen und Nebenwirkungen durch Immunsuppressiva, chirurgisch-technischer und allgemeiner medizinischer Art. Zu nennen sind hier die Urinfistel aus der Ureter-Blasen-Anastomose, die Ureterstenose, Nachblutungen der Gefäßanastomosen, sowie Thrombosierung vor allem der Nierenarterie. Lymphozelen, entstanden durch präparationsbedingte Durchtrennung von Lymphbahnen, können ebenfalls im Bereich des Transplantatlagers zu Komplikationen führen (187).

Rezidive der Grunderkrankung, Infektionen (z.B. HSV, CMV, EBV) sowie gastrointestinale Komplikationen (Ulzera, Kolonperforation, Pankreatitiden) können ebenfalls auftreten und stehen meist mit der immunsuppressiven Therapie in Verbindung (187).

Die meisten Transplantatverluste werden allerdings durch die o.g. Abstoßung verursacht. Dabei ist insbesondere die akute Abstoßung zu nennen, die ihren Häufigkeitsgipfel 1 bis 6 Wochen postoperativ erreicht (77).

1.2.3 Klinische Ergebnisse

Die Ein-Jahres-Überlebensrate der Patienten beträgt 97%, nach 5 Jahren leben noch über 85% (31). Die Ein-Jahres-Transplantatüberlebensrate bei ersttransplantierten Patienten liegen zwischen 85-90% (30,117). Nach 5 Jahren und 10 Jahren können noch 65-70%, bzw. 50% funktionsfähige Organe registriert werden (30,31). 40% der Patienten weisen noch nach 15 Jahren eine funktionstüchtiges Organ auf. Selbst bei Retransplantationen können Ein-Jahres-Transplantatüberlebenszeiten von 80% bei Zweittransplantierten und 70% bei Dritttransplantierten erzielt werden (30,31).

Derzeit warten über 11000 dialysepflichtige Patienten in Deutschland auf eine Niere, 20% auf eine Retransplantation. Währenddessen werden ca. 2000 Nieren pro Jahr in der Bundesrepublik transplantiert. Leider kommen jedes Jahr etwa 1000 neue, terminal niereninsuffiziente Patienten hinzu, so dass die Wartezeit auf ein Organ daher zur Zeit in Deutschland 4 bis 6 Jahre beträgt (30).

1.3 Herztransplantation beim Menschen

1.3.1 Indikation und Kontraindikation der Herztransplantation

Jede terminale, therapierefraktäre Herzinsuffizienz im Stadium IV nach NYHA (New York Heart Association) mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von $< 20\%$ stellt eine Indikation zur Herztransplantation dar. Wie bereits unter 1.2.1 erwähnt, gibt es hier keine Alternativverfahren. Durch ein druckluftgesteuertes extrakorporales Kunstherz, eine implantierte intraaortale Ballonpumpe (IABP) oder die Verwendung eines uni- oder biventrikulären Assist-Systems kann in wenigen Zentren lediglich eine vorübergehende Notfallversorgung zur Verfügung gestellt werden.

Weitere Indikationen bestehen in einer nicht mehr therapierbaren koronaren Herzkrankheit (KHK) im Stadium IV nach CCS (Canadian Cardiovascular Society), in hypertroph-obstruktiven oder restriktiven Kardiomyopathien, in einer Herzinsuffizienz bei Herzklappenerkrankungen oder bei komplexen, angeborenen Vitien. Mit 46% bzw. 45% stellen die dilatative bzw. ischämische Kardiomyopathie (DKMP/IKMP) die häufigste Indikation zur Herztransplantation dar (45). Existiert bereits ein irreversibler pulmonaler Hochdruck, müssen die Patienten einer kombinierten Herz-Lungen-Transplantation zugeführt werden (45).

Angaben zur Herzerkrankung (DKMP, KHK, etc.), zu Begleiterkrankungen (Diabetes mellitus, Lungenfunktionsstörungen, etc.), zur Leber- und Nierenfunktion und zur aktuellen Medikation müssen unbedingt erhoben werden. Zudem müssen zahlreiche Untersuchungen wie z.B. Rechtsherzkatheder, Echokardio- und Elektrokardiogramm, Ergospirometrie sowie laborchemische und serologische Bestimmungen regelmäßig erhoben und beurteilt werden (146).

Neben allgemeinen Kontraindikationen wie eine unzureichende Patienten-Compliance (z.B. schwerer Nikotin-, Drogen- und Alkoholabusus) gelten fortgeschrittene Zweiterkrankungen, wie Tumore, Systemerkrankungen (z.B. Amyloidose), schwere Nierenerkrankungen, akute gastrointestinale Erkrankungen, schwere AVK, schwere zerebrale Durchblutungsstörungen, akute und chronische Infektionen (postoperative, immunsuppressive Therapie!), Lungenembolie innerhalb der letzten 4 Wochen sowie eine fixierte pulmonale Hypertonie als absolute Kontraindikation.

Nach Ausschöpfung der konventionell-chirurgischen Methoden, wie z.B. Klappenersatz, Bypass-OP oder der Implantation eines Automatischen-Implantierbaren-Cardioverter-Defibrillators (AICD), erfolgt, unter Berücksichtigung der jeweiligen Dringlichkeit, die Listung des Patienten bei den Transplantationskoordinationszentralen (siehe 1.2.2). Für die Transplantation wird neben der ABO-Blutgruppengleichheit, negativem Cross-match und möglichst großer HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger auch auf annähernd gleiche Größe und Gewicht von Spender und Empfänger geachtet.

1.3.2 Operationsverfahren

Ähnlich der Nierentransplantation lässt sich auch die Herztransplantation in drei Abschnitte gliedern:

1. Organspende – spezielle Beurteilung des Organs - Organkonservierung
2. Explantation des Empfängerherzens
3. Organimplantation

1. Organspende – spezielle Beurteilung des Organs

Viele Analysen (u.a. Cardiac Transplant Research Data, International Society of Heart and Lung Transplantation) (113) haben gezeigt, dass die Ein-Jahres-Transplantatüberlebenszeit hauptsächlich von dem Spenderalter, der Ischämiezeit und der Notwendigkeit einer Katecholamin- bzw. positiv-inotropen Therapie abhängt.

Zur Spenderevaluierung gehören neben aktuellem EKG, Röntgen-Thorax-Aufnahmen, Koronarangiographie, transthorakal-/ösophagealem Echokardiogramm, Herzenzymen und Spender-Empfänger-Matching (Größe und Gewicht sollten nicht mehr als 20% differieren) die Berücksichtigung besonderer Todesursachen beim Spender.

Nach Freilegung des Herzens durch mediane Sternotomie und Eröffnung des Perikards erfolgt zunächst die makroskopische Beurteilung des Herzens durch den Operateur.

Finden sich keine pathologischen Veränderungen erfolgt das Anschlingen der Vena cava superior und die Einlage der Perfusionslinie. Nach Vollheparinisierung mit 300-400 IE/kg KG (20.000-30.000 IE) i.v. erfolgt nach Unterbindung der oberen Hohlvene, Inzision der linken unteren Pulmonalvene und der Vena cava inferior sowie Klemmen der Aorta ascendens nun die Perfusion des Herzens. Hierzu wird in den meisten Zentren Europas die Bretschneider-HTK-Lösung verwendet (siehe 1.2.2), in einigen anderen findet die St. Thomas-Kardioplegielösung (STH₂) ihre Anwendung (133).

Um eine optimale Oberflächenkühlung zu erzielen, wird das Herz während der kompletten Perfusionsphase zusätzlich mit sterilem Eiswasser („slush-Eis“) gekühlt. Nach Perfusionsende erfolgt die Explantation des heruntergekühlten Organs. Hierzu wird das Herz in der Regel von den großen Gefäßen abgesetzt und zur exakten Beurteilung der intra- und pericardialen Strukturen in Eiswasser auf einem Bauchtuch gelagert. Erfolgt die endgültige Akzeptanz, wird das Organ in einem sterilen 3-Beutel-System verpackt und für den Transport vorbereitet.

2. Explantation des Empfängerherzens

Die Explantation des Empfängerherzens erfolgt ebenfalls unter Vollheparinisierung mit der Standarddosis von ca. 20.000-30.000 IE als Bolus. Ist der Empfängerkreislauf an die Extrakorporalzirkulation (EKZ) angeschlossen, wird die Heparinabgabe mit einer Dosis von 5.000-10.000 IE fortgeführt, um eine Verstopfung der Herz-Lungen-Maschine zu vermeiden. Das Herz wird so abgesetzt, dass der linke Vorhof zur späteren, linksatrialen Anastomose stehen bleibt. Zusätzlich wird darauf geachtet, dass das Empfängerherz gegebenenfalls noch zur Homograftgewinnung herangezogen werden kann.

3. Organimplantation

Die Implantation des Spenderherzens kann entweder heterotop oder orthotop erfolgen. Die heterotope Form wird heute jedoch nur noch in Einzelfällen durchgeführt, so dass hier nur auf die orthotope Implantation eingegangen wird.

Bei der von LOWER und SHUMWAY (100) standardisierten und nach COOLEY (34) und BARNARD (7) modifizierten Technik der Implantation muss unbedingt darauf geachtet werden, dass eine anatomisch korrekte Anastomose beider Atrien erzielt wird. Verziehungen würden sofort zu Klappeninsuffizienzen führen und somit dem Erfolg im Wege stehen.

Eine Alternative zu dieser Implantationstechnik steht in der bicavalen Anastomosierung zur Verfügung. Hier werden beide Vv. cavae sup. et inf. anastomosiert und so durch Intaktklassen des kompletten Spenderherzens vor allem Klappeninsuffizienzen und supraventrikuläre Rhythmusstörungen verringert (35). Nachteil dieser Methode besteht in der längeren Ischämiezeit des Herzens.

Nach Beendigung der Implantation erfolgt für mindestens 20-30 Minuten die Reperusionsphase des komplett entlasteten Herzens. Sobald das Herz wieder seinen Eigenrhythmus hergestellt hat, wird die Herz-Lungenmaschine langsam zurückgefahren.

Früh-postoperative Komplikationen bestehen im Transplantatversagen, Nierenversagen und in Infektionen (bakteriell, viral und mykotisch), welche letal enden können. Zur Vermeidung von Infektionen wird in den meisten Zentren eine Infektionsprophylaxe in Form von Kombinationstherapien vollzogen. Zudem erschweren unter anderem Abstoßungsreaktionen, neurologische Komplikationen, Hypertonie und Diabetes mellitus die Behandlung des Patienten in den ersten Tagen bis Wochen nach der Transplantation. Im Langzeitverlauf stehen neben arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Gicht, Osteoporose, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Adipositas, Tumore und die akzelerierte Koronarsklerose an erster Stelle.

Trotz standardisierter Dreifach-Immuntherapie (Cyclosporin A, Azathioprin, Prednisolon) kommt es innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation häufig zu akuten Abstoßungsreaktionen.

1.3.3 Klinische Ergebnisse

Die Ein-Jahres-Überlebensrate liegt, unter Miteinbeziehung der frühpostoperativen Sterblichkeit, derzeit bei 79%. Nach 5 Jahren leben noch 65% und nach 10 Jahren noch 45% aller transplantierten Patienten (30,75).

Nach der internationalen Statistik stehen ca. 32,5% der Transplantatempfänger wieder voll im Berufsleben, ca. 8,5% arbeiten halbtags und ca. 59% sind berentet. Die längste Überlebensrate nach einer Herztransplantation mit regelrechter Organfunktion beträgt zur Zeit 25 Jahre (133).

Im Jahr 2000 wurden in der Bundesrepublik Deutschland insgesamt 418 Herzen an 30 Transplantationszentren transplantiert. Der Bedarf in Deutschland beträgt ca. 900 Herzen/Jahr, auf der Warteliste befinden sich zur Zeit ca. 700 Patienten (30). Da es, wie bereits oben erwähnt, bei terminalem Herzversagen keine adäquate Alternativtherapie gibt, versterben ca. 1/3 der Patienten während ihrer Wartezeit auf ein geeignetes Spenderherz (116).

Durch die Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie, die verbesserte Abstoßungsdiagnostik sowie durch zunehmende Erfahrungen in der Nachsorge herztransplanterter Patienten hat sich die Herztransplantation als das Therapieverfahren der Wahl bei einer medikamentös ausbehandelten Herzinsuffizienz im Stadium IV nach NYHA fest etabliert.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Seit der ersten erfolgreichen Organtransplantation am Menschen 1954 und mit der Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A im Jahre 1980, sind große Fortschritte in der Behandlung der Organabstoßung erzielt worden. Zwar konnte die 1-Jahres-Überlebensrate perfundierter Organtransplantate auf $> 80\%$ gesteigert werden (6), dennoch zählen die akute und chronische Abstoßung nach wie vor zu den häufigsten Ursachen eines Transplantatverlustes (56). Heutzutage steht nicht mehr die chirurgische Technik im Vordergrund. Vielmehr richtet sich das Augenmerk auf die Entwicklung neuerer Immunsuppressiva und die Verbesserung der Organkonservierungen.

Gebräuchliche Immunsuppressiva sind im klinischen Einsatz aufgrund ihrer Toxizität und geringen therapeutischen Breite nicht unproblematisch. Bisher ist es noch immer nicht gelungen, eine spezifische Toleranz gegenüber dem Transplantat zu induzieren ohne dabei die Reaktionslage des Empfängers gegenüber bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen sowie gegenüber Tumorzellen zu beeinträchtigen. Die Suche nach neuen immunsuppressiv wirkenden Substanzen, die neben guter Wirksamkeit minimale toxische und infektionsfördernde Eigenschaften sowie eine große therapeutische Breite gewährleisten, stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar.

Die Immuntherapie wird neben den o.g. Problemen zusätzlich durch das unterschiedliche Abstoßungsverhalten der Organe einerseits, sowie durch die Sensibilisierung der Organempfänger gegenüber den Major Histocompatibility-Antigenen (MHC-Ag) im Vorfeld der Transplantation (häufige Bluttransfusionen, frühere Organtransplantationen, Schwangerschaften, etc.) andererseits, erheblich kompliziert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das 1999 erstmals in der Transplantationsmedizin als immunsuppressiv wirksam beschriebenes Medikament Gemcitabin (106)

- in bezug auf seine immunsuppressiven Mechanismen am standardisierten allogenen, akuten Herz-Abstoßungsmodell an der Ratte weiter zu untersuchen,
- sowie die immunmodulatorische Wirkung an einem zweiten perfundierten Organtransplantationsmodell (akutes Nieren-Abstoßungsmodell) an der Ratte zu analysieren und
- die immunsuppressive Potenz dieses Medikaments anhand eines akzelerierten Transplantat-Abstoßungsmodells an der Ratte zu testen.

2.1.2 Modell der akuten Herzabstoßung

Auch in diesem Modell wurde direkt nach der Herztransplantation mit der täglichen s.c. Gemzar®-Applikation begonnen. Die Blutentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten und wurde wöchentlich weitergeführt. Die Proben wurden für die Gesamt- und Allo-IgM und IgG-Bestimmungen verwendet.

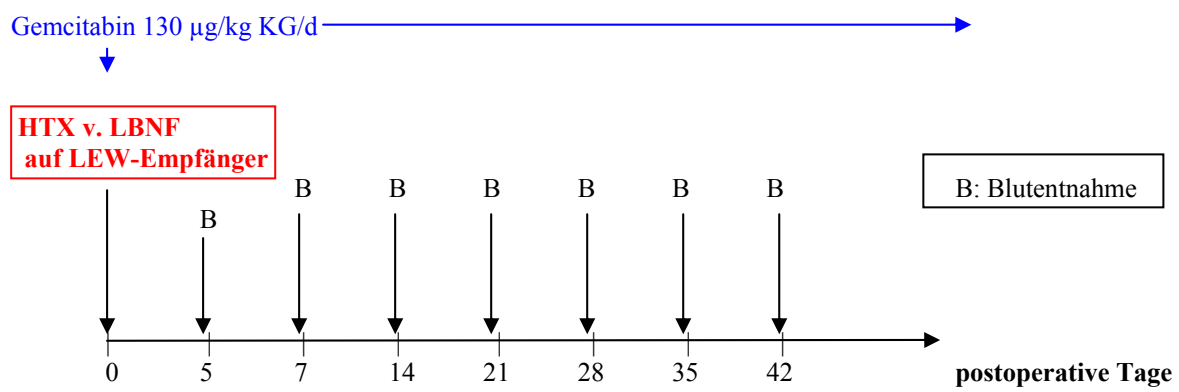


Abb. 7: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs im Modell der akuten Herzabstoßung.
B: Blutentnahme, LEW: Lewis-Ratte, LBNF: (Lewis x Brown-Norway) F₁-Hybrid-Generation,
HTX: Herztransplantat.

2.1.3 Modell der akzelerierten Herzabstoßung

Eine Woche vor der Organtransplantation wurden dem Empfängertier zwei Hauttransplantate einer Brown-Norway-Ratte transplantiert. Die tägliche s.c. Gemzar[®]-Applikation wurde von diesem Zeitpunkt an durchgeführt. Am Tag d0 erfolgte die Transplantation eines LBNF-Herzens. Die Blutentnahme fand zu den angegebenen Zeitpunkten statt und wurde wöchentlich weitergeführt. Die Proben wurden für die Gesamt- und Allo-IgM und IgG-Bestimmungen verwendet.

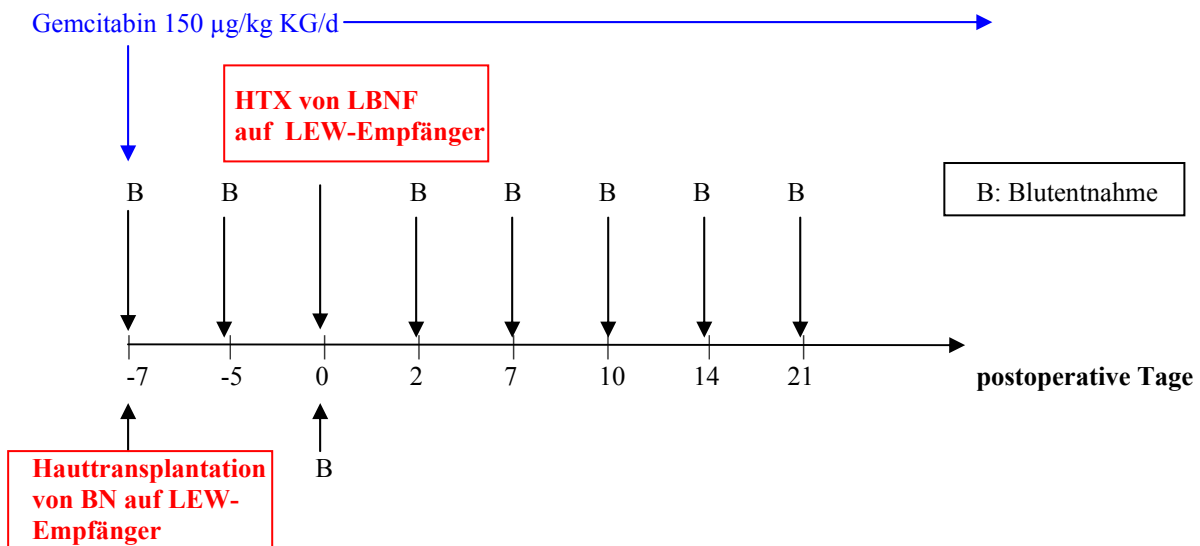


Abb. 8: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs im Modell der akzelerierten Herzabstoßung:
B: Blutentnahme, LEW: Lewis-Ratte, BN: Brown-Norway-Ratte, LBNF: (Lewis x Brown-Norway)
F₁-Hybrid-Generation, HTX: Herztransplantat

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Auswahl der Versuchstiere

Es wurden in allen Experimenten männliche Inzuchttratten (Charles River, WIGA GmbH, D-97633 Sulzfeld) mit einem mittleren Gewicht von 180-250 g verwendet. Um die akute Abstoßungsreaktion im Tiermodell optimal simulieren zu können, wählten wir mit der Lewis / Brown-Norway-Kombination zwei histoinkompatible Rattenstämme mit großer MHC-Differenz aus (62). Die drohende Graft-versus-Host – Reaktion konnte durch Verwendung der (LEW x BN) F₁-Hybrid-Generation (LBNF₁) als Organspender (Niere und Herz) für die Lewis-Empfänger erfolgreich vermieden werden, so dass die Analyse der allogenen Abstoßungsreaktion nicht durch Überlagerung behindert wurde. Für die Simulation einer reproduzierbaren akzelerierten Abstoßung wurden Lewis-Ratten mit Brown-Norway (BN) Hauttransplantaten sensibilisiert (46). Nach der Transplantation eines LBNF-Herzens kam es so durch präformierte Antikörper innerhalb von 24-36 Stunden zu einer fulminanten Abstoßungsreaktion. Um eine genetische Disparität zwischen den Lewis-Ratten auszuschließen wurden zwischen Ratten einer neuen und Ratten einer zurückliegenden sowie zwischen Ratten einer neuen Lieferung isogene Hauttransplantationen durchgeführt. Die Isohistogenität der Lew-Tiere innerhalb des Inzuchtstammes wurde an je einem Lewis-Rattenpaar pro Lieferung durch syngene Nieren- bzw. Herztransplantation überprüft.

2.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Für die Durchführung der Tierversuche lag eine „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ mit dem Az: Gi 20/14-3/97 des Regierungspräsidenten in Gießen vom 27.06.97 vor.

2.2.3 Tierhaltung

Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Ratten in Gruppen von max. 2 Tieren pro Käfig in einem klimatisierten Tierstall gehalten, in dem ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus gegeben war. Die Ernährung erfolgte mit pelletierter Fertignahrung (Altramin, Labortierservice Lage-Lippe) und Trinkwasser ad libidum. Am Tag vor der Operation wurde den Tieren das Futter entzogen.

2.3 Etablierung und Optimierung einer Nierentransplantationstechnik

2.3.1 Nierentransplantation an der Ratte

Die Methode der orthotopen Nierentransplantation an der Ratte war zu Beginn des Projektes an der chirurgischen Klinik der Justus-Liebig-Universität zu Gießen nicht etabliert. Nach Kooperation mit PD Dr. TULLIUS und Dr. PRATSCHKE (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Berlin) wurde das Verfahren in modifizierter Form übernommen.

Initial wurde die entnommene Spenderniere mit eiskalter, physiologischer NaCl- Lösung über die Nierenarterie orthograd perfundiert und anschließend im kalten NaCl-Bad gekühlt, bis das Empfängertier vorbereitet war. Hierbei kam es immer wieder zu nicht erklärbaren Funktionsverlusten des Transplantates. Wir vermuteten, dass die Perfusion der entnommenen Niere häufig zu einem Parenchymschaden führte und verließen daher diese Methode.

Das Verfahren wurde dahingehend modifiziert, dass dem Spendertier 5 min. vor der Organentnahme 1 ml Liquemin über die Penisvene appliziert wurde, so dass das Blut in dem zu entnehmenden Organ vollständig antikoaguliert war. Die entnommene Niere wurde nicht mehr perfundiert. Nach Abklemmen der Arteria renalis sinistra wurde gewartet, bis das Organ möglichst blutleer war.

Anschließend erfolgte die Durchtrennung der Gefäße und die Aufbewahrung des Transplantates in einer Petrischale, die mit einer 4°C kalten Kochsalzlösung gefüllt war. Die Filtrationsleistung der so transplantierten Nieren war zwar besser, aber vereinzelt auftretende Nachblutungen führten dazu, dass wir die Antikoagulation modifizieren mussten. Durch Reduzierung der Liqueminmenge konnte das Problem gelöst und jede nachfolgende Operation nach dieser Methode durchgeführt werden (siehe Abschnitt 2.4.3).

Zur Qualitätskontrolle erfolgte der Ausschluss aller Tiere mit einer Ischämiezeit von > 30 Minuten.

2.3.2 Narkose

Die anfangs benutzte Kombination aus Isoflurane[®] und Nembutal[®] (Sanofi Cava, bezogen von Wirtschaftsgenossenschaft Dt. Tierärzte EG, 3000 Hannover) musste verlassen werden, da Nembutal[®] für den deutschen Markt nicht mehr produziert wurde. Als Ersatz diente Narcoren[®], ein Barbiturat, welches sich in der intraperitonealen Applikationsweise sehr schlecht dosieren ließ, so dass später nur unter einer Isoflurane[®]-Masken-Narkose operiert wurde.

2.4 Operationsverfahren

2.4.1 Narkose

Sämtliche operativen Eingriffe erfolgten in Narkose. Die Tiere wurden dabei in einer mit Isoflurane[®] (Isofluran Baxter, Baxter Caribe Inc., Guayana Puerto Rico 00784) angereicherten Glaskammer betäubt und erst nach Eintritt der Narkose aus der Kammer entnommen. Während der Operation bekam das Tier die Erhaltungsdosis über ein Falcon-Röhrchen (50 ml, Fa. NUNC, Dänemark) zugeführt, in dem sich mit Inhalationsanästhetikum getränkte Mullkompressen befanden. Dieses wurde dem Tier über die Schnauze gestülpt, wodurch sich die Intensität der Narkose in Abhängigkeit vom jeweiligen Narkosestadium durch Verschieben des Röhrchens variieren ließ.

2.4.2 Operationsvorbereitung

Die narkotisierten Tiere wurden im Bereich des Thorax und des Abdomens, bei Hauttransplantationen im Bereich der Flanken, mit einer Schermaschine rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Anschließend erfolgte, je nach Bedarf, eine Entnahme von 0,3-0,5 ml Blut. Die zur Operation verwendeten Standardinstrumente (s. Abb. 9) wurden mit Bodephen[®] Flüssigkonzentrat gereinigt, jedoch nicht sterilisiert. Die Operation der Nierentransplantation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Universal S3, Fa. Zeiss, Germany), die Gefäßanastomosen während der Herztransplantation wurden mit Unterstützung einer Lupenbrille (zweifache Vergrößerung, Opti Visor, Donagan optical Company, INC, Lenexa, Kansas, USA) durchgeführt.



Abb. 9 : Verwendete Instrumente

- 1: Mikrochirurgische Pinzetten
- 2: Mikrochirurgischer Nadelhalter
- 3: Mikrochirurgische Schere
- 4: chirurgische Pinzette
- 5: Nadelhalter
- 6: breite Schere
- 7: schmale Schere
- 8: modifizierte Roux-Haken
- 9: Klemmen, spitz und stumpf
- 10: Gefäßklemmen
- 11: 10/0-Faden für mikrochirurgische Naht
- 12: Nahtmaterial für Bauchnaht
- 13: Wundspreizer

2.4.3 Orthotope Nierentransplantation

Die orthotope Nierentransplantation wurde modifiziert nach der Methode von TULLIUS und PRATSCHKE (persönliche Kommunikation, siehe Abschnitt 2.3.1) durchgeführt. Hierbei dient die Niere nicht nur als Organtransplantationsmodell, sondern erfüllte auch von Beginn an die Ausscheidungsfunktion, welche durch Kontrollen (vgl. 2.5.1) gut überwacht werden konnte.

1. *Vorbereitung des Empfänger-Tieres*

Das Empfängertier wurde zunächst, nach ausreichender Anästhesie und Rasur, in Rückenlage auf einer Korkplatte gelagert. Die Extremitäten wurden mit Gummibändern fixiert. Nach Desinfektion mit Alkohol fand die mediane Laparotomie statt. Das Darmkonvolut wurde mit Kochsalzlösung getränkten Kompressen bedeckt und nach latero-cranial verlagert. Nach Darstellung der linken Nierengefäße wurde das Abdomen mit zwei modifizierten Baby-Roux-Haken aufgehalten und anschließend der retroperitoneale Raum freigelegt. Die linke Arteria und Vena renalis wurden mit mikrochirurgischen Instrumenten freipräpariert und separiert (scharf-stumpfe Operationstechnik). Beim Empfängertier musste bis zu dem Abgang aus der Aorta abdominalis / der Einmündung in die Vena cava inferior präpariert werden, um nach dem Setzen der Gefäßklemmen noch ausreichend Platz für die Anastomosierung zu haben. Je nach anatomischem Verlauf, mussten die linke Arteria und Vena suprarenalis mit 7/0-Seidenfäden (Perma-Handseide, 0,5 metric, Ethicon, Norderstedt) ligiert und durchtrennt werden (siehe Abb. 10). Von einer generellen Ligatur der Vena suprarenalis sin. wurde im weiteren Verlauf abgesehen. In einzelnen Fällen musste die Vena testicularis sin. ebenfalls mit 7/0-Seidenfäden ligiert und durchtrennt werden.

Nach der Präparation der Gefäße erfolgte die Präparation des linken Ureters. Dabei musste genügend periureterales Fettgewebe belassen werden, um spätere Mikrostenosierungen zu vermeiden. Nach Durchtrennung des Ureters wurde die Nierenarterie mit Papaverin beträufelt, um den Gefäßspasmus zu beheben. Danach erfolgte das Abklemmen der Arterie und anschließend der Vene mit einer Biemer-Gefäßklemme (siehe Abb. 12). Nach Durchtrennung der Gefäße konnte die Niere entnommen werden, der Bauchraum wurde mit einer befeuchteten Mullkompressen bedeckt.

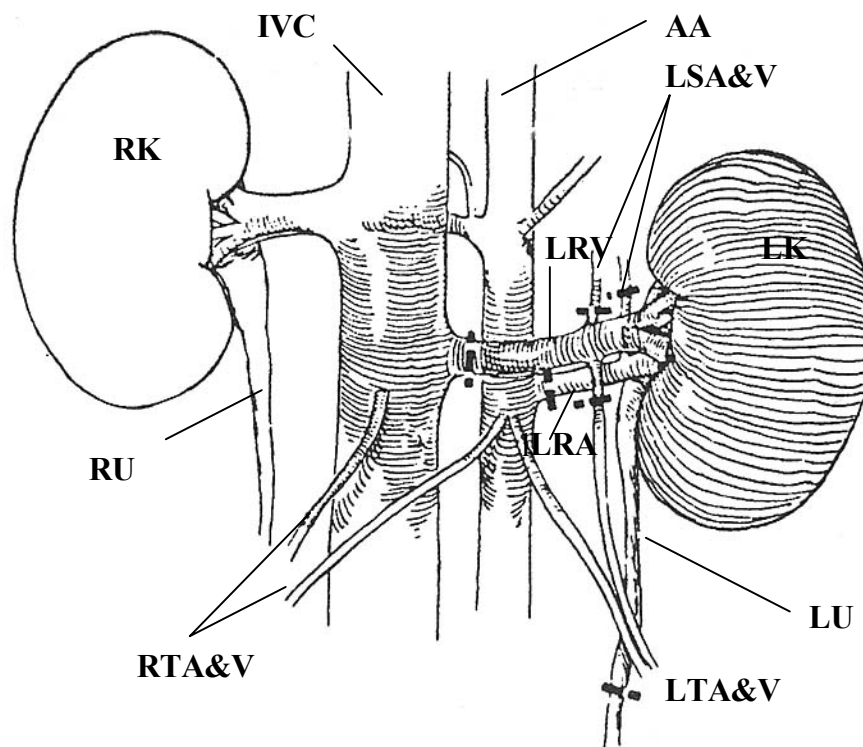


Abb. 10: Topografie der wichtigsten Arterien und Venen der Bauchhöhle einer männlichen Lewis-Ratte. Ansicht von ventral. IVC: Vena cava inferior; AA: Aorta abdominalis; RK: rechte Niere; RU: rechter Ureter; RTA&V: rechte Arteria und Vena testicularis; LK: linke Niere; LRA: linke Arteria renalis; LRV: linke Vena renalis; LSA&V: linke Arteria und Vena suprarenalis; LTA&V: linke Arteria und Vena testicularis. Quelle: Begleitheft eines urologischen Praktikums

2. Spender-OP (Nieren-Entnahme)

In der nun anschließenden Nierenentnahme beim Spendertier wurde die Niere durch die gleiche Vorgehensweise wie beim Empfängertier dargestellt.

Hierbei fand unmittelbar nach der Laparotomie eine kontinuierliche Kühlung der Niere durch Beträufelung mit eiskalter, physiologischer Kochsalz-Lösung statt. Das Freipräparieren und die Separation der Gefäße geschah hier nur auf einem kurzen Stück, um spätere Torsionen, vor allem der Vene, zu vermeiden. Die Gefäße der paravasal gelegenen Lymphknoten wurden mit 10/0-Ethilonfäden (0,2 metric, monofil, Ethicon, Norderstedt) ligiert und durchtrennt. Nach Injektion von 0,1 ml (500 I.E.) Liquemin über die Penisvene erfolgte die Präparation des Ureters und die Mobilisation der Niere.

Nach 5 min. Verteilungszeit wurde die Arterie mit Papaverin beträufelt und der Ureter durchtrennt. Nach Abklemmen der Nierenarterie mit einer Mikropinzette bis zur optischen Blutleere der Niere, erfolgte die Durchtrennung der Arterie und anschließend der Vene mit einer Mikroschere. Um das Transplantat beim Herausnehmen nicht zu verletzen, musste unbedingt auf die „nontouch-technique“ (97) geachtet werden. Das Herunterkühlen erzielte man durch die vorübergehende Aufbewahrung für ca. 5-8 Minuten in einem eiskalten Kochsalz-Lösung-Bad (0,9 %), während das Empfängertier für die Transplantation vorbereitet wurde.

3. Organimplantation

Nach korrekter Platzierung des Organs im Abdomen konnte mit der End-zu-End Anastomosierung an die Empfängergefäße begonnen werden. Bis zur Freigabe der Zirkulation wurde die Niere mit eiskalter 0,9%-iger NaCl-Lösung beträufelt. Die Anastomosierung fand nach der sog. „Fadenrotationsweise“ statt, bei der die beiden zu anastomosierenden Gefäßstümpfe an korrespondierenden Punkten der gegenüberliegenden Zirkumferenz (180°, seitliche Position, siehe Abb. 11) mit zwei Haltefäden (10/0-Ethilon, 0,2 metric, Ethicon, Norderstedt) fixiert wurden. Mit Hilfe dieser Haltefäden konnten die Gefäßhinterwände durch Rotation der Gefäßquerschnitte um 180° optimal nach vorne gebracht und so unter direkter Sicht anastomosiert werden.

Nach Positionierung der Haltefäden wurde zunächst die Vorderwand der Arterie, je nach Gefäßdurchmesser, mit 2-3 Einzelknopfnähten (10/0-Ethilon, 0,2 metric, Ethicon, Norderstedt) anastomosiert. Nach der o.g. Rotation fand die Naht der Hinterwand nach gleichem Schema statt. Insgesamt wurde so die arterielle Anastomose mit 6-8 Einzelknopfnähten genäht (siehe Abb. 12).

Bei der venösen Anastomose wurden ebenfalls 2 Haltefäden in gleicher Position wie bei der Arterie gesetzt, um anschließend mit 10/0-Ethilon (0,2 metric, monofil, Ethicon, Norderstedt) die Vorderwand fortlaufend zu nähen. Nach Rotation erfolgte in gleicher Weise die Naht der Rückwand.

Nach der Fertigstellung beider Anastomosen, erfolgte das Freigeben der Zirkulation. Um eine Nierenstauung zu vermeiden, wurde zuerst die venöse Klemme entfernt. Nach Beseitigung der arteriellen Klemme, zeigte sich das transplantierte Organ innerhalb von 20-30 Sekunden rosig und schied nach 1 bis 2 Minuten spontan Urin aus (siehe Abb. 13).

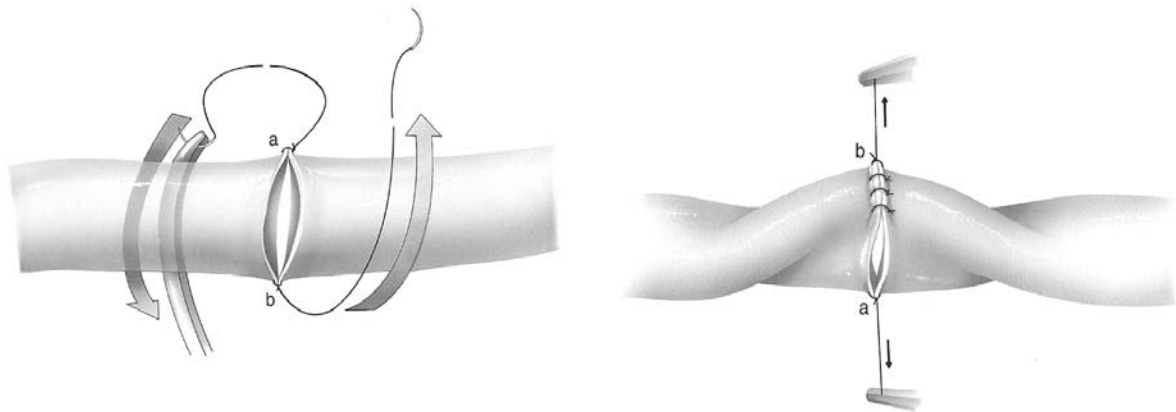


Abb. 11: Technik der Fadenrotation (153)

Nach Kürzung des Ureters auf eine spannungsfreie Länge, die noch eine gestreckte Lage erlaubte, wurde die Uretero-Ureterostomie mit 6 bis 7 Einzelknopfnähten (10/0-Ethilon, 0,2 metric, Ethicon, Norderstedt) durchgeführt. Um einen Torsionsschaden aufgrund der Rotation zu vermeiden, fand zunächst die Naht der Rückwand, dann die der beiden Seitenwände und zuletzt die der Vorderwand statt. In einzelnen Fällen war eine Ligatur der distalen Uretergefäße notwendig.

Zur Volumensubstitution wurden dem Tier 1-2 ml isotoner Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Nach Rückverlegung des Darmes erfolgte der zweischichtige Verschluss des Abdomens mit 4/0-Vicrylfäden (1,5 metric, Ethicon, Norderstedt) und 4/0- Prolenefäden (1,5 metric, Ethicon, Norderstedt). Die Hautnaht wurde mit Sprühpflaster besprüht und das Tier anschließend bis zum Aufwachen unter einer Rotlichtlampe gewärmt.

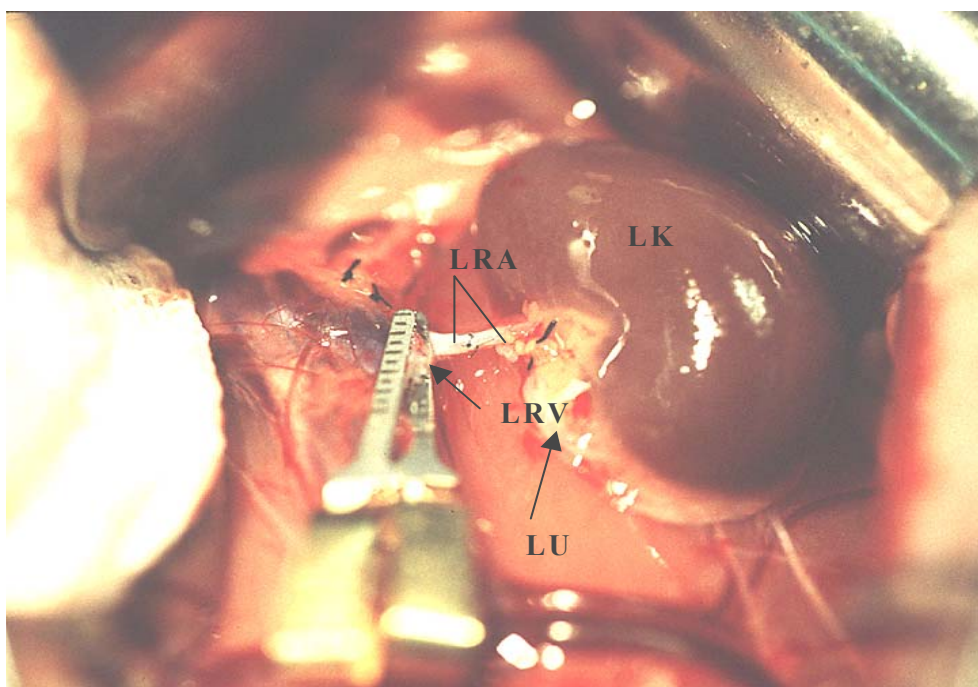


Abb. 12: Operationssitus, die Anastomose der linken A. renalis ist bereits fertiggestellt. LK: linke Niere; LU: linker Ureter; LRV: linke Vena renalis; LRA: linke Arteria renalis.

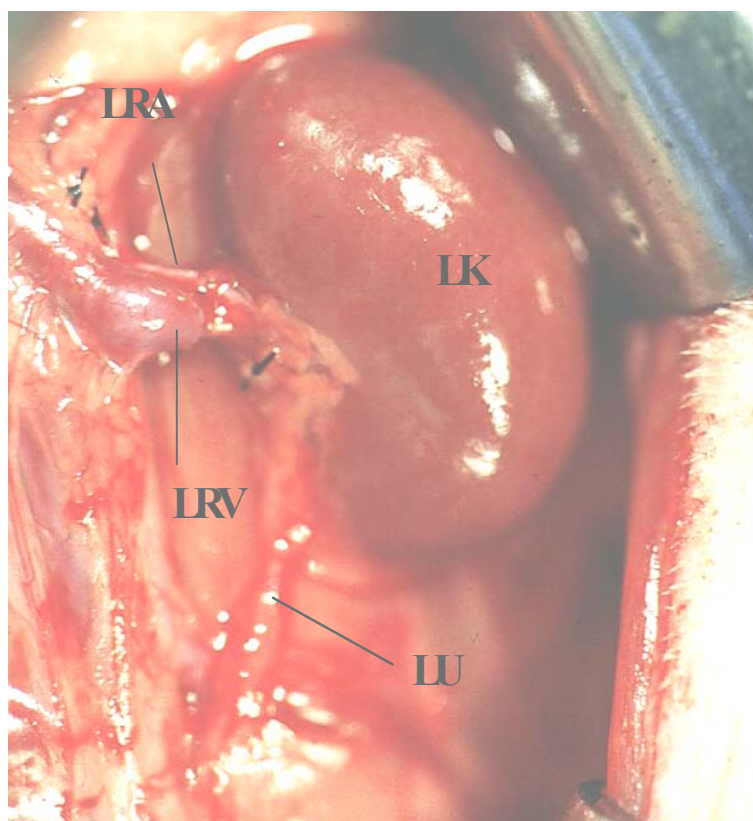


Abb. 13: Operationssitus nach Fertigstellung aller Anastomosen und Freigabe der Blutzirkulation. LK: linke Niere; LU: linker Ureter; LRV: linke Vena renalis; LRA: linke Arteria renalis.

2.4.4 Heterotope Herztransplantation

Die Herztransplantation fand nach der von ONO und LINDSAY (125) beschriebenen Technik in modifizierter Form nach SCHMID und BINDER (147) statt. Hierbei erfüllte das transplantierte Herz keine hämodynamische Funktion. Der Zustand des Organtransplantats konnte durch nichtinvasive Kontrollen (vgl. 2.5.2) gut überwacht werden.

1. *Vorbereitung des Empfänger-Tieres*

Wie bei der Nierentransplantation wurde auch in diesem Modell zuerst das Empfängertier vorbereitet. Nach der medianen Laparotomie erfolgte das Bedecken des Darmes mit einer Kochsalz-Lösung (0,9%) getränkten Mullkompressen und die Verlagerung nach extraabdominell. Nach Freilegung des Retroperitoneums wurden die großen Bauchgefäße caudal der Nierengefäßabgänge bis kurz oberhalb der Bifurkation freigelegt und mittels stumpfer Präparation isoliert. Die dorsalen Abgänge der Kollateralgefäße mussten penibel aufgesucht und ligiert werden, um eventuelle Blutungen zu vermeiden. Zudem musste gelegentlich die rechte Vena testicularis ligiert und durchtrennt werden. Die Aorta wurde proximal abgeklemmt (Mikro-Gefäßklemme), um die proximale Vena cava inferior wurde ein Tourniquet mit 4/0-Seidenfaden (Perma-Handseide, 1,5-metric, Ethicon, Norderstedt) locker geschlungen. Die distalen Gefäßabschnitte wurden ebenfalls mit einem 4/0-Seidenfaden-Tourniquet angeschlungen (siehe Abb. 14). Nach Anziehen des caudalen Tourniquets wurde der, nun von der Gefäßzirkulation ausgesparte, Teil der Aorta mit einer Mikroschere durch einen Längsschnitt eröffnet und das Gefäßlumen mit 0,9%-iger Kochsalz-Lösung ausgespült, bis keine Blutgerinnsel mehr vorhanden waren. Zur Vorbereitung der späteren fortlaufenden Gefäßnaht, setzten wir in das craniale und caudale Schnittende je einen Eckfaden (7/0-Prolene, 0,5 metric, monofil, Ethicon, Norderstedt). Bis zur Implantation des Spenderherzens wurde der Operationssitus durch feuchte Mullkompressen bedeckt.

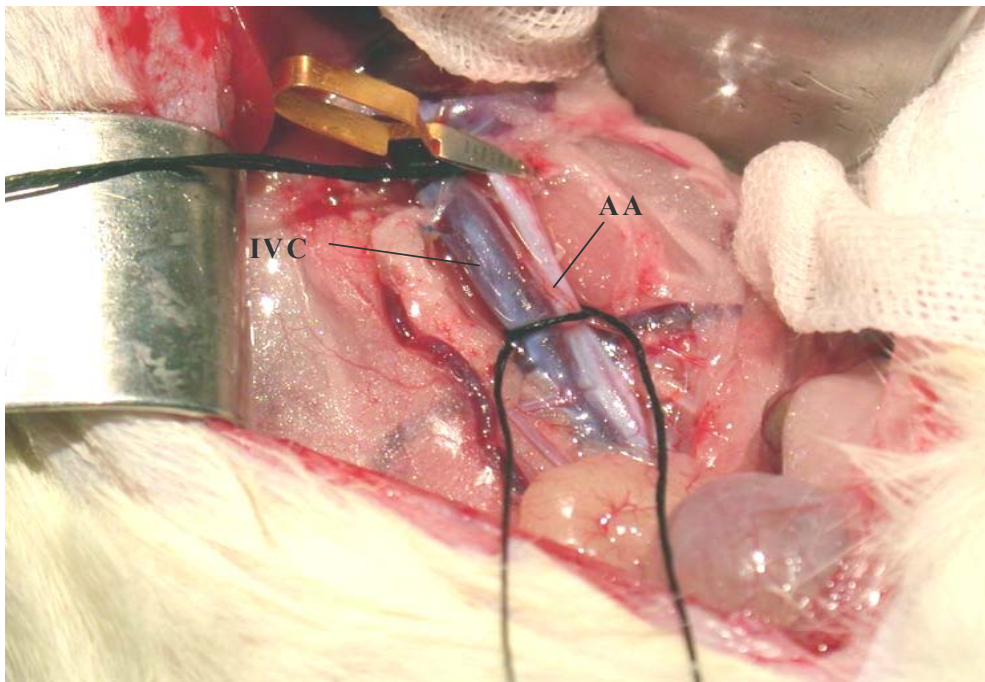


Abb. 14: Operationssitus nach Anschlingen der großen Bauchgefäße und Abklemmen der Aorta abdominalis. AA: Aorta abdominalis; IVC: Vena cava inferior.

2. Spender-OP (Herz-Entnahme)

In der anschließenden Herzentnahme beim Spendertier fand die Freilegung des Herzens durch eine anteriore bilaterale Thorakotomie (Clamshell) und Klappen der ventralen Thoraxwand nach cranial statt. Nach vorsichtigem Abpräparieren von Thymus und Lymphknoten wurden die Aorta ascendens und die Pulmonalarterien freipräpariert. Nachdem die obere und untere Hohlvene kurz vor ihrer Mündung in den rechten Vorhof, sowie die Venae pulmonales knapp vor ihrem Eintritt in das linke Atrium mit 4/0-Seidenfäden ligiert und durchtrennt wurden, erfolgte die Durchtrennung der Aorta ascendens und der Arteria pulmonalis weit distal (siehe Abb. 15). Anschließend wurde das Herz über diese Gefäßstümpfe mit eiskalter physiologischer Kochsalz-Lösung gespült.

Das behutsam entnommene Herz wurde dem Empfängertier in den rechten, unteren Quadranten des Abdomens platziert und kontinuierlich mit gekühlter, isotonischer Kochsalzlösung beträufelt.

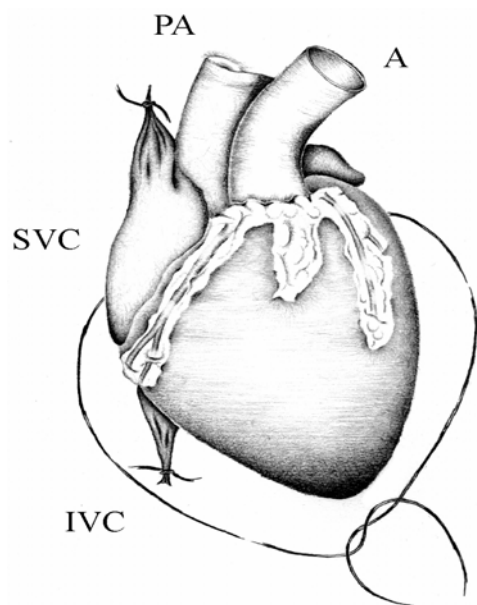


Abb. 15: Herztransplantat mit ligierter Vena cava inferior et superior. Durch Zug am Loop werden die Pulmonalvenen auf der Rückseite des Herzens ligiert. A: Aorta; PA: Arteria pulmonalis; SVC: Vena cava superior; IVC: Vena cava inferior. Skizze aus einer Habilitationsschrift (88)

Die Anastomosierung erfolgte End-zu-Seit, indem die Spenderaorta dem proximalen und distalen Ende der Inzision adaptiert, und mit Hilfe der vorbereiteten Eckfäden zwei fortlaufende Gefäßnähte zwischen Aorta abdominalis des Empfängertieres und der Aorta ascendens des Spenderherzens mit jeweils 4-5 Stichen gelegt wurden.

Nach Fertigstellung der linken Seite der Anastomose und Drehung des Herzens auf die andere Seite, konnte die rechte Seite anastomosiert werden. Nach Zuziehen des cranial angelegten Tourniquets wurde das isolierte Segment der Vena cava inferior in gleicher Weise wie die Arterie eröffnet und das Gefäßlumen gründlich gespült. Danach wurde die Pulmonalarterie End-zu-Seit von distal beginnend, ebenfalls fortlaufend, mit der Vena cava anastomosiert. Die Freigabe der Zirkulation erfolgte durch Lockern der venösen Ligaturen und anschließendem Öffnen der arteriellen Gefäßklemme. Nach Füllung der Koronarien mit arteriellem Blut begann das transplantierte Herz nach 30 Sekunden wieder zu flimmern. Nach kurzer manueller Kompression der Atrien entwickelte das Herz wieder seinen Sinusrhythmus (siehe Abb. 16).

Nach Rückverlegung des Darmes erfolgte zur Flüssigkeitssubstitution die intraperitoneale Applikation von 1-2 ml isotoner Kochsalzlösung, und das Abdomen wurde zweischichtig, fortlaufend mit 3/0-Vicrylfäden (2 metric, Ethicon, Norderstedt) verschlossen.

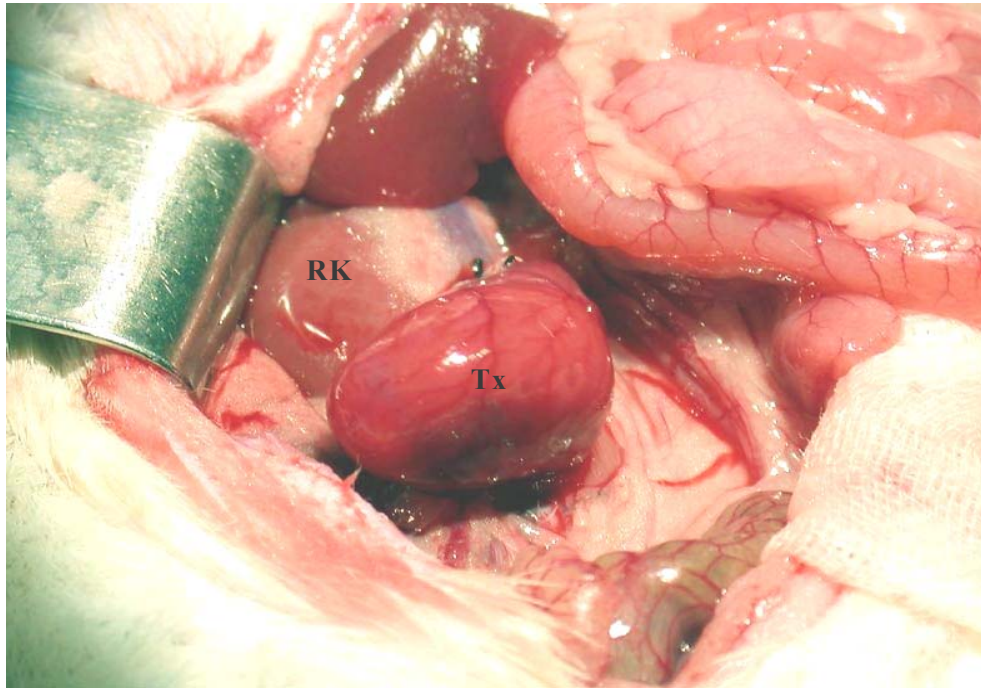


Abb. 16: Heterotop transplantiertes Herz nach Freigabe der Zirkulation .
Tx: Herztransplantat; RK: rechte Niere.

2.4.5 Nephrektomie

Um die Funktion der transplantierten Niere überprüfen zu können, erfolgte am 6. postoperativen Tag an jedem Tier aus der Nierengruppe die Nephrektomie der Gegenseite.

Nach o.g. standardisierter Vorbereitung und medianer Laparotomie wurde der Darm extraabdominell und in feuchten Kompressen geschützt nach außen verlagert. Mit Hilfe zweier Baby-Roux-Haken wurde der Bauchraum aufgehalten. Nach Darstellung der Nierengefäße wurden diese separiert, mit 7/0-Seidenfäden ligiert und durchtrennt. Zur Sicherung des Nierenarterienstumpfes erfolgte die Anlage einer zusätzlichen Durchstichligatur (7/0-Ethilon, Ethicon, Norderstedt). Nachdem der Ureter mit einem 7/0-Seidenfaden ligiert und anschließend mit einer Mikroschere durchtrennt wurde, konnte die Niere entnommen und der Bauchraum, wie in 2.4.3 beschrieben, in zwei Schichten verschlossen werden.

2.4.6 Hauttransplantation

Zum Ausschluss einer genetischen Disparität und zur Simulation einer akzelerierten Abstoßungsreaktion wurden einer Lewis-Ratte bzw. einer Brown-Norway-Ratte zwei runde Vollhauttransplantate, im Durchmesser ca. 3 cm groß, aus dem Flankenbereich entnommen (siehe Abschnitt 2.2.1). Diese wurden anschließend einer Lewis-Ratte mit einer fortlaufenden Naht (3/0-Prolene 2 metric, Ethicon, Norderstedt) in einen gleich großen Defekt über der lateralen Thoraxwand eingenäht und mit Sprühpflaster im Randbereich geschützt.

2.4.7 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte im akuten Modell an folgenden Tagen: d0 (Organ-Tx), d2, d5, d7 und anschließend wöchentlich. Im akzelerierten Modell fand sie an den Tagen: d-7 (Haut-Tx), d-5, d0 (Organ-Tx), d2, d7, d10, d14 und anschließend wöchentlich statt.

Dazu wurde dem narkotisierten Tier in Rückenlage über eine Punktion der Schwanzvene mit einer 26 G x 23 mm-Kanüle (Firma Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium), je nach Bedarf, 0,5-1 ml Blut entnommen.

2.5 Kontrolle der Transplantatfunktion

2.5.1 Nierenmodell

Am 6. p.o. Tag fand die Relaparotomie und rechtsseitige Nephrektomie des Tieres statt. Nach 24 Stunden wurde die Diurese des Tieres durch Beobachtung in einem Stoffwechselkäfig kontrolliert. In diesem Käfig befand sich das Tier für mindestens 8 Stunden. Wurde Urin ausgeschieden, galt dies für eine funktionsfähige Niere. Im weiteren Verlauf kamen die Tiere wöchentlich einmal in den Käfig, um die Ausscheidungsfähigkeit zu beurteilen. Anurie, Oligurie, Gewichtszunahme oder Tremor des Tieres (beginnende Urämie) wurden als Zeichen einer beginnenden Abstoßung definiert. In Zweifelsfällen wurde das Transplantat durch eine explorative Laparotomie direkt beurteilt.

2.5.2 Herzmodell

Das Schlagen des transplantierten Herzens wurde täglich durch Palpation im Flankenbereich des Tieres überprüft. Die Einteilung der Schlagkraft des Herzens erfolgte von 3 bis 1 (3: 100%, 2: 75%, 1: 50%). Als Zeitpunkt der Abstoßung wurde der Tag angegeben, an dem keine myokardiale Kontraktion mehr zu tasten war. In Zweifelsfällen fand auch hier eine direkte Beurteilung des Organs durch eine explorative Laparotomie statt.

2.6 Immunsuppressive Protokolle

Gemzar[®] (Gemcitabin) wurde von der Firma Lilly (Bad Homburg, Deutschland) in einer Dosis von 40 mg/ml zur Verfügung gestellt und so alliquotiert, dass die gewünschte Dosis von 130 bzw. 150 µg/kg KG in 0,5 ml NaCl gelöst war. Die subkutane Applikation des Volumens fand einmal täglich unter einer leichten Isoflurane[®]-Narkose statt. Die erste Gabe erfolgte unmittelbar postoperativ, daraufhin alle 24 Stunden.

2.7 In vitro-Untersuchungen

2.7.1 Gesamt IgM- und IgG-Antikörperbestimmungen

Die Bestimmungen der Gesamt-IgM- und IgG-Antikörper erfolgten mit Radialer Immundiffusion nach MANCINI, FAHEY und Mc KELVEY (54,102). Hierfür wurden die Seren für die IgM-Bestimmungen 1/5, für die IgG-Bestimmungen 1/10 verdünnt und auf die entsprechenden Platten (speziell für Ratten, Bind a Rid, The Binding Site Limited, Birmingham, England) aufgetragen. Diese Platten beinhalteten eine Gel-Beschichtung, in der die spezifischen Antikörper (Rat Proteins NL Bind a Rid TM, RN RN 338.3 und 332.3) homogen verteilt waren. Während der Inkubationszeit von 96h (IgM), bzw. 72h (IgG) unter Raumtemperatur diffundierte das darin enthaltene Antigen nun radial in das Gel und wurde dadurch verdünnt. Im Äquivalenzbereich präzipitierten die Antigen-Antikörper-Komplexe in Form eines Ringes. Bei der Methode nach MANCINI ist die Antigen-Konzentration mit dem Durchmesser des Präzipitatrings im Quadrat proportional. Anschließend wurden die Ringe unter Zuhilfenahme spezieller Lupen abgelesen und mit Hilfe der RID Reference Tabelle ausgewertet.

2.7.2 Allospezifische IgM- und IgG-Antikörperbestimmungen

Die Bestimmungen der spenderspezifischen, allo-genen IgM- und IgG-Antikörper im Serum behandelter Tiere erfolgten mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS).

Nach Gewinnung der Zielzellen (Spenderlymphozyten, 1.5×10^5) aus zervikalen Lymphknoten von LBNF₁-Ratten mittels Stahlnetzpassage geschah die 30 minütige Inkubation dieser Spender-Lymphozyten mit den zuvor verdünnten (1/4 bis 1/32) und hitzeinaktivierten Serumproben der transplantierten und mit Gemzar behandelten Tiere bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit PE-markierten (FL2, Fa. Pharmingen) spezifischen Ziegen-Antikörpern gegen μ -Ketten der Ratten IgM und mit FITC-markierten (FL1, Fa. Pharmingen) spezifischen Ziegen-Antikörpern gegen die Fc-Fraktion der Ratten IgG inkubiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen der Zellen und die Fixierung mit 1 %-igem Formalin. Als Kontrolle dienten Spenderlymphozyten aus zervikalen Lymphknoten unbehandelter Lewis und Brown-Norway Ratten, die mit verdünntem allospezifischen Antikörper-Serum (IgM, IgG) inkubiert wurden. Die Sortierung der Zellen fand nach folgender Methode mit dem EPICS C cell sorter (Coulter, Hialeah, FL, USA) statt. Hierbei wurden die Oberflächenmoleküle der zu bestimmenden Zellen mit spezifischen fluoreszierenden Reagenzien versetzt und in eine vibrierende Fließkammer gegeben. Der Zellstrom wurde in einer Pufferlösung an einem Laserstrahl (488 nm Wellenlänge) vorbeigeleitet, wobei im Durchlicht die Größe jeder einzelnen Zelle in einer 90° Ablenkung des Lichtstrahls der Gehalt der Granula sowie rote (Phycoerythrin, PE) und grüne (Fluorescein-Isothiocyanat, FITC) Fluoreszenz und damit die gewünschten Oberflächenmarker gemessen wurden. Die Vibration führte zu einer Verteilung des Zellstroms in feine Tröpfchen, die aufgeladen und unter Computerkontrolle durch Ablenkungsplatten nach den zu messenden Parametern sortiert wurden (14).

2.7.3 Zytotoxizitätstest

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) töten Zellen ab, die entweder keine, fremde oder aberrierende MHC-Moleküle exprimieren. Die Funktion der NK-Zellen kann mit einer abgewandelten, nicht radioaktiven Version des klassischen „Chrom-release-assay“, dem Cyto Tox 96[®] (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Fa. Promega Corporation, Madison, USA) getestet werden (90). Bei dem Test wird die freigesetzte Menge des intrazellulären Enzyms LDH bestimmt, welches durch eine Zell-Lyse freigesetzt wird. Dies geschieht durch den Substratumbau des INT (Tetrazolium salt) zu einem roten Farbkomplex. Die Extinktion dieses Produkts wird bei 490 nm abgelesen. Dabei ist die Höhe der Extinktion proportional der Menge der lysierten Zellen.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Lymphozytenisolierung zunächst aus dem Vollblut über den Dichtegradienten. Hierzu wurde verdünntes, heparinisiertes Blut über eine Schicht von Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077 g/Liter) geschichtet, ohne dass dabei eine Vermischung stattfand. Nach der Zentrifugation flottierten die Zellen mit geringerer Dichte (Lymphozyten, Monozyten) über dem Ficoll, während sich alle anderen Blutbestandteile am Boden des Röhrchens absetzten. Die Lympho- und Monozyten konnten nun aus der Schicht zwischen Ficoll und verdünntem Plasma abpipettiert werden. Durch kurzes Aufbewahren der Zellsuspension in einer Plastikschaale konnte man die Lymphozyten isoliert auswaschen, da die Monozyten durch Adhärenz am Plastik hängen blieben.

Im Plattenansatz (96-Loch-Mikrokulturplatte mit U-förmigem Boden, Fa. NUNC, Wiesbaden-Biebrich) wurden die Lymphozyten der mit Gemzar[®] behandelten Tiere (Effektorzellen) in verschiedenen Konzentrationen (40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1) mit den Lymphozyten der Spendertiere (Targetzellen) bei 37° C über 4 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden die Lymphozyten der Gemzar[®] behandelten Tiere separat in gleicher Konzentration inkubiert. Als spontan-release oder Background wurden jene Zellen ermittelt, bei denen es spontan zur Lyse kam. Zusätzlich wurde eine positiv-Kontrolle (100% Lyse) sowie eine negativ-Kontrolle (keine Lyse) ermittelt.

Nach der Inkubationszeit fand die 4-5 minütige Zentrifugation der Platten statt, um anschließend den abgesaugten Überstand in einer 96-Loch-Mikrokulturplatte mit flachem Boden (Fa. NUNC, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland) mit 50µl Substratlösung zu inkubieren (30 Minuten bei Raumtemperatur, vor Lichteinstrahlung schützen). Abschließend wurde die Reaktion mit einer Stop-Lösung zum Stillstand gebracht, und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

Für die Berechnung des Lyseindex galt folgende Formel:

$$\frac{\text{Ext. Probe (Lymphos Gemzar+Spender)} - \text{Ext. Background (Gemzar und Spender)}}{\text{Ext. Maximum Lysis (Spender)} - \text{Ext. Background (Spender)}}$$

Die Angabe des Lyseergebnisses erfolgte in Prozent (Divisionsergebnis x 100).

2.7.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Als Parameter für die T-Zellfunktion wird oft die Proliferationsfähigkeit bzw. die suppressive Eigenschaft der Zellen untersucht (Lymphozyten-Stimulationstest). Hierfür werden die Zellen für 72 bis 96 Stunden im Brutschrank bei 37° C in 5% CO₂ kultiviert. Nach ca. 48 Stunden beginnt die Zellteilung, welche mit einer Verdopplung des DNA-Gehaltes einhergeht.

Das Prinzip des „Cell Proliferation ELISA, BrdU colometric“ (Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland) besteht in der Messung des - anstelle des Thymidins - in die DNA proliferierender Zellen eingebauten Pyrimidin-Analogons BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine). Die Menge des eingebauten BrdU korreliert dabei mit der Menge der proliferierenden Zellen (145).

Der Test bestand aus verschiedenen Zellkomponenten. Als Responderzellen dienten Lymphknotenzellen aus den transplantierten und immunsuppremierten Tieren (Lew^{exp}), die Stimulatorzellen wurden aus den Lymphknotenzellen einer Brown-Norway-Ratte herangezogen. Die notwendigen Lymphozyten wurden aus einem bis drei Lymphknoten der jeweiligen Ratten durch eine Stahlnetzpassage gewonnen.

Nach Zellzahl-Einstellung der 0-Kontrolle (native Lewis-Ratte, Lew^{nat}), der Positiv-Kontrolle (transplantierte Lewis-Ratte, keine Immunsuppression, Lew^{pos}) und der experimentellen Gruppe (Responder, transplantierte Lewis-Ratte, mit Gemzar behandelt, Lew^{exp}) auf $6 \times 10^6/\text{ml}$, fand nun die Präparierung der Stimulatorzellen (Lymphozyten einer Brown-Norway-Ratte) mit einer Zellzahl von $6 \times 10^6/6 \text{ ml} + 164 \text{ } \mu\text{l}$ Mytomicin (Stoppen der Proliferation, noch Antigen wirksam) statt. Um die Zellen vollständig vom Mytomicin zu befreien, wurde die Suspension nach 30 Minuten Inkubation dreimal in Puffer-Lösung gewaschen.

Die Komponenten wurden in einer standardisierten 96-Loch-Mikrokulturplatte mit flachem Boden (Fa. NUNC, Wiesbaden-Biebrich) nach unten dargestelltem Schema mit einem Endvolumen von $200 \text{ } \mu\text{l}$ pro Loch angesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation.

0-Kontrolle:	$100 \text{ } \mu\text{l}$ Lymphos Lew^{nat} + $100 \text{ } \mu\text{l}$ Medium
positiv-Kontrolle:	$100 \text{ } \mu\text{l}$ Lymphos Lew^{pos} + $100 \text{ } \mu\text{l}$ Stimulator
experimentelle Gruppe:	$100 \text{ } \mu\text{l}$ Lymphos Lew^{exp} + $100 \text{ } \mu\text{l}$ Stimulator

Nach drei Tagen Inkubation wurde den Gruppen jeweils $20 \text{ } \mu\text{l}$ BrdU-Lösung zugegeben, und die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden inkubiert. Während dieser Periode geschah der Einbau des BrdU anstelle des Thymidins in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen. Nach den 24 Stunden wurden die Platten mit den Zellen abzentrifugiert und die Zellen nach 15 minütigem Fönen mit der Fix Denat-Lösung fixiert. Die hierbei entstandene Denaturierung der DNA machte die eingebauten BrdU's für die spezifischen Antikörper zugänglicher. Nach 30 Minuten Fixierung fand das Herausnehmen aus der Fix Denat-Lösung und die Zugabe von Anti-BrdU-Lösung statt.

Nach weiteren 90 Minuten erneuter Inkubationszeit erfolgte das dreimalige Waschen (à 15 Minuten) der Platten in Puffer-Lösung. Nach Zugabe der Substrat-Lösung, wurden die Platten erneut für 20 Minuten inkubiert, bevor die Reaktion mit H_2SO_4 abgestoppt wurde und das Messen der Extinktion bei 450 nm erfolgte.

Ob die Responderzellen (transplantierte Lewis-Ratte, mit Gemzar behandelt, $\text{Lew}^{\text{exp.}}$) durch die Inkubation mit den Stimulatorzellen mit einer Proliferation reagierten, oder diese Fähigkeit durch die Behandlung mit Gemcitabin verloren ging, lässt sich nach folgendem Stimulationsindex quantifizieren:

$$\frac{\text{Extinktion experimentelle Gruppe} - 0\text{-Kontrolle}}{\text{Positiv-Kontrolle} - 0\text{-Kontrolle}}$$

2.7.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die mRNA-Transkriptexpression verschiedener, für die Abstoßung relevanter, Moleküle im Transplantat wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. VOLK (Institut für Medizinische Immunologie, Medizinische Fakultät Charité, Berlin) mit dem ausführlich beschriebenen Verfahren einer RT-PCR (14,155) bestimmt. Das Reaktionsprinzip bestand in der Wiederholung eines zyklischen Reaktionsablaufs, dessen Einzelschritte bei genau definierten Temperaturen durchgeführt wurden. Die PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer (1,5% Agarose-Gel) Auftrennung mittels Ethidiumbromid-Interkalierung im UV-Licht sichtbar gemacht und die Daten dabei mit einem speziellen Software-Paket (Herolab, Berlin) analysiert.

Die Höhe der Gen-Transkriptexpression wurde dargestellt als die höchste Verdünnung des Kontrollfragmentes, welches gerade noch einen nachweisbaren Wert unter den gegebenen Konditionen zeigte.

2.8 Versuchsgruppen

2.8.1 Transplantatüberlebenszeiten

Hinsichtlich der Transplantatüberlebenszeit wurden folgende Versuchsgruppen getestet:

- syngene Nierentransplantation, keine Immunsuppression (n=6)
- allogene Nierentransplantation, akutes Abstoßungsmodell, keine Immunsuppression (Kontrollgruppe) (n=8)
- allogene Nierentransplantation, akutes Abstoßungsmodell, Gemzar-Dosierung 150 µg/ kg KG/Tag (n=6)
- syngene Herztransplantation, keine Immunsuppression (n=6)
- allogene Herztransplantation, akutes Abstoßungsmodell, keine Immunsuppression (Kontrollgruppe) (n=6)
- allogene Herztransplantation, akutes Abstoßungsmodell, Gemzar-Dosierung 130 µg/ kg KG/Tag (n=8)
- allogene Herztransplantation, akzeleriertes Abstoßungsmodell, keine Immunsuppression (Kontrollgruppe) (n=4)
- allogene Herztransplantation, akzeleriertes Abstoßungsmodell, Gemzar-Dosierung 150 µg/ kg KG/Tag (n=7)

2.8.2 Gesamt IgM- und IgG-Bestimmungen

Die Gesamt IgM- und IgG- Antikörperbestimmungen wurden an Tieren der nachstehenden Versuchsgruppen bestimmt:

- Nierentransplantiert, akutes Abstoßungsmodell und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert (n=6)
- Herztransplantiert, akutes Abstoßungsmodell und mit Gemcitabin 130 µg/kg KG/Tag therapiert (n=5)
- Herztransplantiert, akzeleriertes Abstoßungsmodell und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert (n=7)

2.8.3 Allospezifische IgM- und IgG-Bestimmungen

Zur Bestimmung der alloenen IgM- und IgG-Antikörper wurde Tieren aus den nachfolgenden Versuchsgruppen regelmäßig Blut entnommen:

- Nierentransplantiert, akutes Abstoßungsmodell und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert (n=6)
- Herztransplantiert, akutes Abstoßungsmodell und mit Gemcitabin 130 µg/kg KG/Tag therapiert (n=8)

2.8.4 Zytotoxizitätstest

Zur Funktionsprüfung der NK-Zellen wurde folgenden Tieren am 6. Tag nach der Organtransplantation Vollblut zur Lymphozyten-Gewinnung entnommen.

- Nierentransplantiert und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert (n=4)
- Nierentransplantiert ohne immunsuppressive Therapie (n=2)

2.8.5 Gemischte Lymphozytenproliferation (MLR)

Von der nachfolgend aufgelisteten Versuchsgruppe wurden am 6. postoperativen Tag Lymphknotenzellen für den MLR-Test gewonnen.

- Nierentransplantiert und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert (n=4)

2.8.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Untersuchung der mRNA-Transkriptexpression verschiedener Zytokine und Oberflächenantigene wurden die Organe folgender Versuchsgruppen entnommen.

- Nierentransplantiert und mit Gemcitabin 150 µg/kg KG/Tag therapiert und Transplantatüberlebenszeit > 100 Tage (n=2)
- Nierentransplantiert ohne immunsuppressive Therapie (n=6)

2.9 Statistik

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen wurden mittels Student'schem T-Test verglichen. Als signifikant galten Unterschiede mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Von der Auswertung ausgeschlossene Tiere

Sämtliche Tiere (n=12), bei denen die Nierentransplantate aufgrund technischer Schwierigkeiten einer kalten Ischämiezeit über 30 Minuten ausgesetzt waren, wurden aus Gründen der Qualitätssicherung nicht in der Auswertung berücksichtigt. 3 Tiere boten zwischen Tag 21 und Tag 27 ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden. Nach Euthanasie zeigte sich bei der Sektion ein stark dilatiertes Nierenbecken sowie ein proximal dilatierter Ureter, der auf 2/3 seiner Strecke eine partielle Striktur aufwies. Typische Zeichen einer Organabstoßung konnten hier weder makroskopisch noch histologisch diagnostiziert werden. Ein Tier verstarb am Tag 7 an einem Strangulationsileus, 2 weitere Tiere mussten aufgrund eines Platzbauches 24 h postoperativ von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Von der Auswertung ausgeschlossene Tiere			
	Gruppe	Überleben (d)	Grund/Sektionsbefund
12	Kontrolle NTX		Ischämiezeit > 30 min
3	NTX akut	21,25,27	Ureterobstruktion, Hydronephrose
1	NTX akut	7	Strangulationsileus
2	HTX akut	1	Platzbauch

Tab. 2: Von der Auswertung ausgeschlossene Tiere.

3.2 Testung der Inzuchtstämme

Mit einer isologen Hauttransplantation zwischen Ratten einer neuen und Ratten einer zurückliegenden sowie zwischen Ratten innerhalb einer neuen Lieferung von Versuchstieren konnte eine uneingeschränkte Transplantattoleranz nachgewiesen werden. Es fanden sich in allen Fällen keinerlei Zeichen einer akuten Abstoßung, wie Schrumpfung oder Haarverlust der Transplantate, so dass eine genetische Disparität ausgeschlossen werden konnte.

3.3 Transplantatüberlebenszeiten bei der Nierentransplantation (NTX)

3.3.1 Syngene Nierentransplantation

Die Nierentransplantation unter isogenen Tieren wurde an je einem Lewis-Rattenpaar pro Versuchstierlieferung durchgeführt, um die Isohistogenität der LEW-Tiere innerhalb des Inzuchtstammes zu sichern. Hierbei zeigte sich in allen Fällen (n=6) eine unbegrenzte Transplantatüberlebenszeit. Auch nach über 100 Tagen kam es bei keinem Tier zu einer Abstoßungsreaktion.

3.3.2 Allogene Nierentransplantation im akuten Abstoßungsmodell

Eine allogene Nierentransplantation zwischen Lewis-Ratten (LEW, RT 1) als Nierenempfänger und Lewis x Brown-Norway (LEW x BN) F₁-Hybrid-Ratten als Nierenspender ohne immunsuppressive Therapie führte in allen Fällen (n=8) zu einer akuten Abstoßungsreaktion. Die mittlere Transplantatüberlebenszeit von $x = 5,88 \pm 0,64$ Tagen wurde dabei als Kontrollwert für die immunsuppressiven Protokolle verwendet.

Eine Übersicht über die Transplantatüberlebenszeiten der unbehandelten Kontrollgruppe zeigt Tabelle 3.

Gruppe	Tier								MW	SD
Kontrollgruppe NTX akut Überleben (d)	KN 1	KN 2	KN 3	KN 4	KN 5	KN 6	KN 7	KN 8		
	5	5	6	6	6	6	6	7	5,88	0,64
MW Mittelwert	SD Standardabweichung									

Tab. 3: Transplantatüberlebenszeiten der Nierenkontrollgruppe (allogene NTX, akutes Abstoßungsmodell, unbehandelt).

3.3.3 Immunsuppressive Protokolle bei der Nierentransplantation

Die Behandlung mit der Gemcitabindosis von 150 µg/kgKG begann unmittelbar postoperativ und wurde alle 24h fortgeführt. Im Rahmen dieser Behandlung zeigten die Transplantate eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Die genauen Transplantatüberlebenszeiten der einzelnen Tiere ($n=6$) können der Tabelle 4 entnommen werden.

Gruppe	Tier						MW	SD
exper. Gruppe NTX akut	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6		
Überleben (d)	29	31	50	57	109	133	68,17	42,99
MW Mittelwert	SD Standardabweichung							

Tab. 4: Transplantatüberlebenszeiten der experimentellen Gruppe (allogene NTX, akutes Abstoßungsmodell, Gemzar- Dosierung von 150 µg/kgKG/d).

Einen direkten Vergleich der Transplantatüberlebenszeiten zwischen Kontrollgruppe und experimenteller Gruppe zeigt Abbildung 17 (s.u.).

3.4 Transplantatüberlebenszeiten bei heterotoper Herztransplantation (HTX)

3.4.1 Syngene Herztransplantation

Auch im Herztransplantationsmodell wurden an je einem Lewis-Rattenpaar pro Versuchstierlieferung isologe Herztransplantationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich in allen Fällen ($n=6$) eine unbegrenzte Transplantatüberlebenszeit über 100 Tage.

3.4.2 Allogene Herztransplantation im akuten Abstoßungsmodell

Die allogene Herztransplantation zwischen Lewis-Ratten (LEW, RT 1) als Organempfänger und Lewis x Brown-Norway (LEW x BN) F₁-Hybrid-Ratten als Herzspender ohne immunsuppressive Therapie führte ebenfalls in allen Fällen (n=6) zu einer akuten Abstoßungsreaktion. Hier diente die mittlere Transplantatüberlebenszeit von $x = 7 \pm 0,63$ Tagen als Kontrollwert für die immunsuppressiven Protokolle. Folgende Herztransplantat-Überlebenszeiten wurden beobachtet.

Gruppe	Tier						MW	SD
Kontrollgruppe	KH 1	KH 2	KH 3	KH 4	KH 5	KH 6		
HTX akut								
Überleben (d)	6	7	7	7	7	8	7	0,63
MW Mittelwert	SD Standardabweichung							

Tab. 5: Transplantatüberlebenszeiten der Herzkontrollgruppe (allogene HTX, akutes Abstoßungsmodell, unbehandelt).

3.4.3 Allogene Herztransplantation im akzelerierten Abstoßungsmodell

Für das akzelerierte Abstoßungsmodell wurden Lewis-Ratten (LEW, RT 1) 7 Tage vor der Organtransplantation durch Hauttransplantate von Brown-Norway (BN)-Ratten sensibilisiert. Am Tag 7 nach der Hauttransplantation erfolgte die Herztransplantation. Hierbei dienten erneut Lewis x Brown-Norway (LEW x BN) F₁-Hybrid-Ratten als Herzspender. Die akzelerierte Organabstoßung trat in allen Fällen (n=4) nach spätestens 36 Stunden auf. Als Kontrollwert für die weiteren immunsuppressiven Protokolle diente die mittlere Transplantatüberlebenszeit von $x = 1,39 \pm 0,13$ Tagen.

Gruppe	Tier				MW	SD
Kontrollgruppe	ACCR 1	ACCR 2	ACCR 3	ACCR 4		
HTX akzeleriert						
Überleben (d)	1,3	1,5	1,25	1,5	1,39	0,13
MW Mittelwert	SD Standardabweichung					

Tab. 6: Transplantatüberlebenszeiten der Kontrollgruppe (allogene HTX, akzeleriertes Abstoßungsmodell, unbehandelt).

3.4.4 Immunsuppressive Protokolle bei der Herztransplantation

Die Behandlung mit der Gemcitabindosis von 150 µg/kgKG im akzelerierten Modell begann unmittelbar nach der Hauttransplantation und wurde alle 24h fortgeführt. Im akuten Modell wurden die Empfänger-Ratten mit einer Dosis von 130 µg/kgKG/d behandelt. Hier erfolgte die erste Applikation unmittelbar nach der Organtransplantation. Es zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine hochsignifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit sowohl im akzelerierten ($p < 0,0001$) als auch im akuten ($p < 0,003$) Modell. Die einzelnen Transplantatüberlebenszeiten können den Tabellen 7 und 8 entnommen werden.

Gruppe	Tier								MW	SD
exper. Gruppe HTX akut Überleben (d)	H 1	H 2	H 3	H 4	H 5	H 6	H 7	H 8		
	28	28	50	52	22	20	50	45	36,875	13,643
MW Mittelwert	SD Standardabweichung									

Tab. 7: Transplantatüberlebenszeiten der experimentellen Gruppe (allogene HTX, akutes Abstoßungsmodell, Gemzar-Dosis von 130 µg/kgKG/d.

Gruppe	Tier								MW	SD
exper. Gruppe HTX akzel. Überleben (d)	ACCR 5	ACCR 6	ACCR 7	ACCR 8	ACCR 9	ACCR 10	ACCR 11			
	5	6	4	6	4	6	4		5	1
MW Mittelwert	SD Standardabweichung									

Tab. 8: Transplantatüberlebenszeiten der experimentellen Gruppe (allogene HTX, akzeleriertes Abstoßungsmodell Gemzar-Dosis von 150 µg/kgKG/d.

Direkte Vergleiche der Transplantatüberlebenszeiten zwischen den jeweiligen Kontroll- und -experimentellen Gruppe zeigt Abbildung 17 a-c.

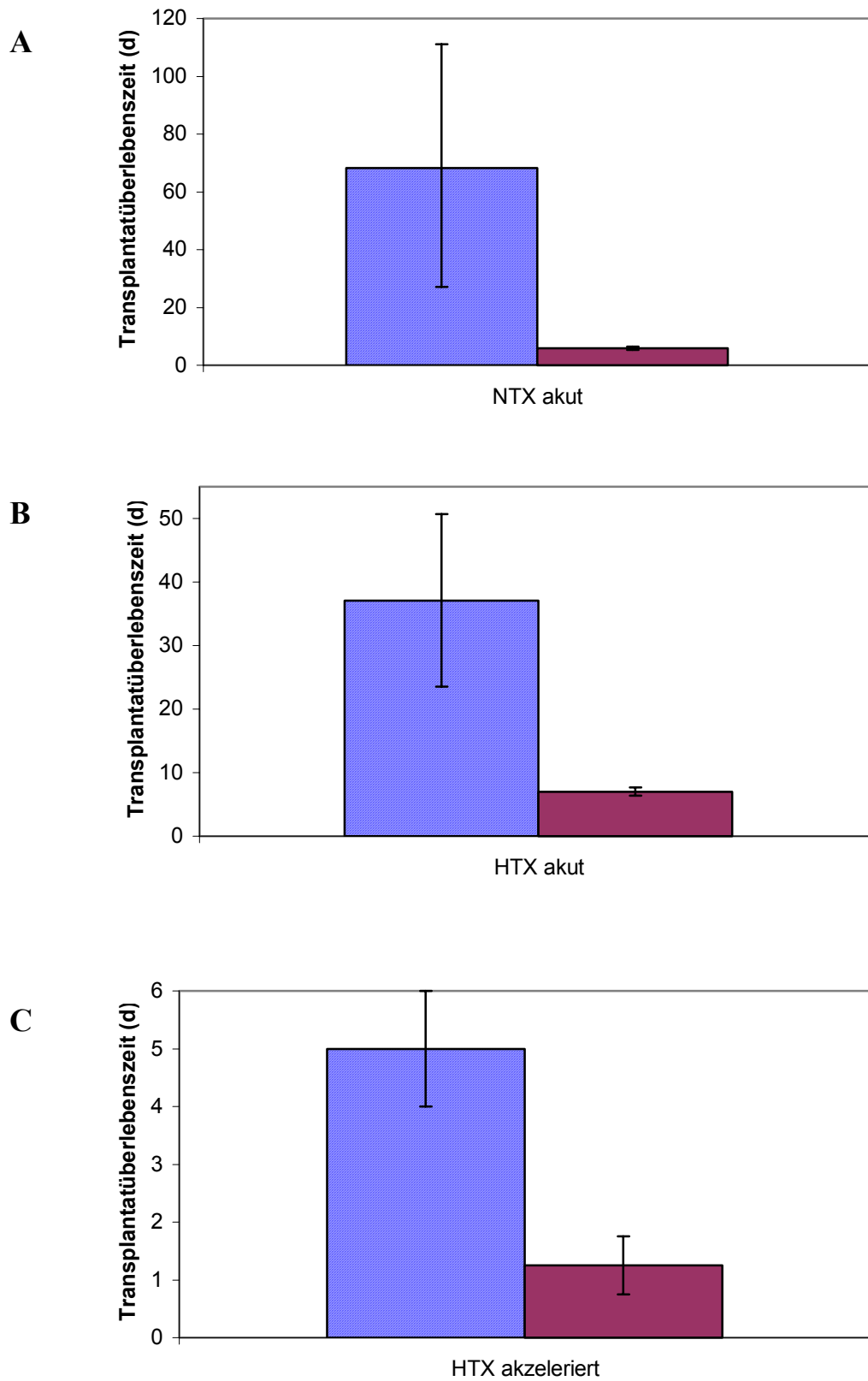


Abb. 17: Transplantatüberlebenszeiten, A: NTX akut, $p < 0,005$; B: HTX akut, $p < 0,003$; C: HTX akzeleriert, $p < 0,0001$; blau: experimentelle Gruppe, rot: Kontrollgruppe

3.5 Übersicht: Immunsuppressive Protokolle

Gruppe	n	Behandlung	Dosis µg/kgKG/d	MW Überlebenszeit (d)	SD	p
KN	8	---	---	5,9	± 0,64	
N	6	Gemzar	150	68,2	± 43	< 0,005
KH	6	---	---	7	± 0,63	
H	8	Gemzar	130	36,9	± 13,6	< 0,003
ACCR 1-4	4	---	---	1,39	± 0,13	
ACCR 5-11	7	Gemzar	150	5	± 1	< 0,0001

Tab. 9: Übersicht der Immunsuppressiven Protokolle.

Erläuterung:

KN: Kontrollgruppe allogene NTX, akutes Modell
 N: experimentelle Gruppe allogene NTX, akutes Modell
 KH: Kontrollgruppe allogene HTX, akutes Modell
 H: experimentelle Gruppe allogene HTX, akutes Modell
 ACCR 1-4: Kontrollgruppe allogene HTX, akzeleriertes Modell
 ACCR 5-11: experimentelle allogene HTX, akzeleriertes Modell
 n: Anzahl der Tiere in der Gruppe
 MW: Mittelwert der Transplantatüberlebenszeit
 SD: Standardabweichung
 p: signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe

3.6 In vitro Untersuchungen

3.6.1 Gesamt IgM- und IgG-Bestimmungen

Sämtliche Tiere aus der Gemzar®-Gruppe im Nierentransplantationsmodell zeigten für mehr als 4 Wochen postoperativ eine signifikante ($p < 0,05$) Unterdrückung sowohl der IgM- als auch der IgG-Antikörper. Einen Überblick über den Verlauf beider Antikörperspiegel in dieser Gruppe zeigen Tabelle 10 und 11.

	Gesamt IgM (mg/l)								
Tier/Tag	0	2	7	14	21	28	35	42	49
N 1	1265	902	1265	902	729	328			
N 2	1265	990	1360	1172	815	483			
N 3	2980	1457	1265	902	902	178	178	178	178
N 4	1457	1457	990	815	564	178	178	292	178
N 5	990	1457	815	564	252	564	564	405	564
N 6	1457	1457	729	564	178	328	795	178	178
MW	1569	1287	1071	820	573	343	429	263	275
SD	712	265	264	232	300	157	305	109	193
Prozent	100	82	68	52	37	22	27	17	18
MW: Mittelwert SD: Standardabweichung									

Tab.10: Gesamt IgM-Spiegel im allogenen akuten Nierentransplantationsmodell, Gemzar®-Dosierung 150 µg/kgKG/d.

	Gesamt IgG (mg/l)								
Tier/Tag	0	2	7	14	21	28	35	42	49
N 1	2720	2020	2260	990	2480	2260			
N 2	3200	2020	2260	1190	2480	2260			
N 3	4800	4270	2260	1010	1360	1360	1130	795	795
N 4	2400	1990	1360	1730	1730	1130	1010	1072	795
N 5	1990	1990	1010	905	1130	1360	1130	1130	1010
N 6	3130	2680	1990	1130	795	1010	795	795	795
MW	3040	2495	1857	1159	1663	1563	1016	948	849
SD	974	911	542	298	703	556	158	178	108
Prozent	100	82	61	38	55	51	33	31	28
MW: Mittelwert SD: Standardabweichung									

Tab. 11: Gesamt IgG-Spiegel im allogenen akuten Nierentransplantationsmodell, Gemzar®-Dosierung 150 µg/kgKG/d.

Die Gruppe des experimentellen allogenen, akuten Herzmodells wurde mit einer Gemzar®-Dosis von 130 µg/kgKG/d behandelt. Auch hier kam bei es allen Tieren zu einer hochsignifikanten ($p < 0,001$) Unterdrückung der IgM- und IgG-Antikörper über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen. Die Tabellen 12 und 13 geben einen Überblick, in den Abbildung 18 und 19 wird exemplarisch für alle anderen Gruppen der Ak-Verlauf graphisch dargestellt.

	Gesamt IgM (mg/l)				
Tier/ Tag	0	5	7	14	21
H 1	1265	1080	1265	990	1860
H 2	1964	1172	815	646	483
H 3	1555	729	646	1457	1080
H 4	2071	815	252	990	1757
H 5	1860	729	729	546	405
MW	1743	905	741	926	1117
SD	329	207	363	320	684
Prozent	100	52	43	53	64
MD: Mittelwert SD: Standardabweichung					

Tab.12: Gesamt IgM-Spiegel im allogenen akuten Herztransplantationsmodell
Gemzar®-Dosierung 130 µg/kgKG/d.

	Gesamt IgG (mg/l)				
Tier/Tag	0	5	7	14	21
H 1	2480	2260	2260	2260	4240
H 2	5950	3770	2830	2400	2400
H 3	4270	2830	2400	2980	4800
H 4	5750	3610	795	2680	2400
H 5	5350	2980	2830	2260	1990
MW	4760	3090	2223	2516	3166
SD	1430,28	612,66	837,97	310,93	1262,93
Prozent	100	65	47	53	67
MW: Mittelwert SD: Standardabweichung					

Tab.13: Gesamt IgG-Spiegel im allogenen akuten Herztransplantationsmodell
Gemzar®-Dosierung 130 µg/kgKG/d.

Alle Tiere aus der Gruppe der akzelerierten Abstoßung bekamen unmittelbar nach der Hauttransplantation, d.h. 7 Tage vor der Organtransplantation, und anschließend alle 24 Stunden die Gemzar-Dosis von 150 µg/kgKG/d appliziert. Es zeigte sich eine deutliche Verzögerung und Unterdrückung der IgM- und IgG-Antikörperproduktion (Tab. 14 und 15).

	Gesamt IgM (mg/l)										
Tier/Tag	-7	-5	0	2	7	10	14	21	28	35	42
ACCR 5			1757	1172	405	328	1080	2071	1964	1964	1655
ACCR 6			1457		483	405	328	1457	2512	2400	1757
ACCR 7			1265		729	405	483	1964	1757	1655	1555
ACCR 8			1172	902	564	361	902				
ACCR 9	1172	1172	902	564	1265		1360	1860	1964	1964	
ACCR 10	1265	990	564	328			2627	2627			
ACCR 11	1655	1457	815	483	1860		3101	3348	3224	2512	
MW	1364	1206	1133	690	884	375	1412	2221	2284	2099	1656
SD	256	235	407	342	568	37	1060	669	595	352	101
Prozent	100	88	83	51	65	28	104	163	168	154	121
MD: Mittelwert SD: Standardabweichung											

Tab.14: Gesamt IgM-Spiegel im allogenen akzelerierten Herztransplantationsmodell, Gemzar®-Dosierung 150 µg/kgKG/d. Bemerkung: Gemzar®-Therapie wurde zum Zeitpunkt der Organabstoßung (Tag 4-6) gestoppt.

	Gesamt IgG mg/l										
Tier/Tag	-7	-5	0	2	7	10	14	21	28	35	42
ACCR 5			3200	2480	2020	1070	1810	5960	9240	11900	14300
ACCR 6			2260		1590	690	740	3460	10300	15200	15200
ACCR 7			2720		1190	590	790	5080	7860	10300	9960
ACCR 8			4100	2680	2400	1600	1730				
ACCR 9	2680	2400	1860	1360	3450		4800	9650	10600	11100	
ACCR 10	4270	3130	2260	1240			12700	20200			
ACCR 11	3450	2980	2400	1860	12500		14700	13100	15600	18300	
MW	3467	2837	2686	1924	3858	988	5324	9575	10720	13360	13153
SD	795	386	752	646	4304	458	5908	6261	2932	3331	2802
Prozent	100	82	78	56	111	29	154	276	309	385	379
MD: Mittelwert SD: Standardabweichung											

Tab.15: Gesamt IgG-Spiegel im allogenen akzelerierten Herztransplantationsmodell, Gemzar®-Dosierung 150 µg/kgKG/d. Bemerkung: Gemzar®-Therapie wurde zum Zeitpunkt der Organabstoßung (Tag 4-6) gestoppt.

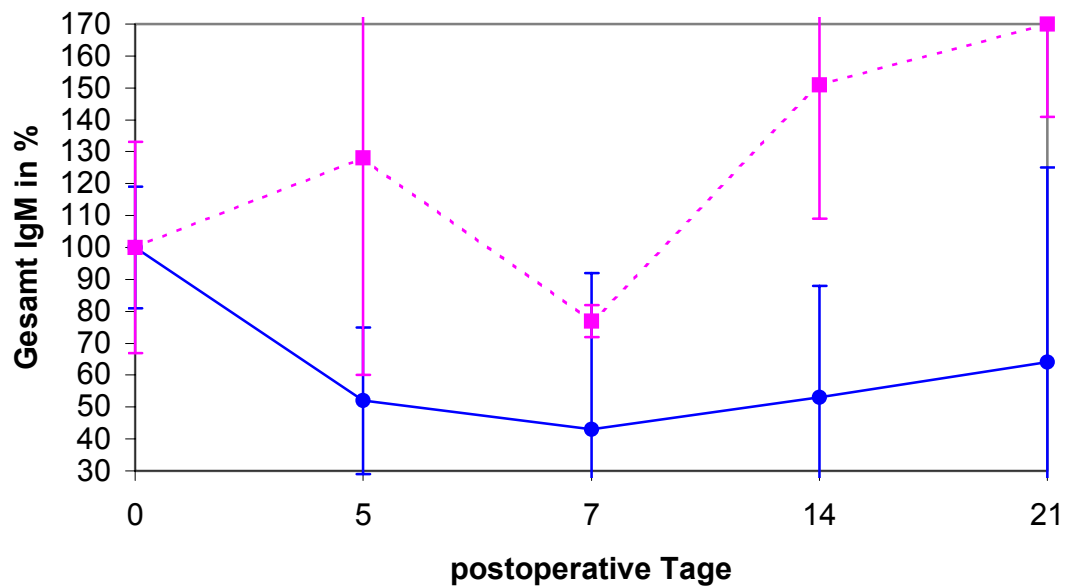


Abb. 18: Einfluss von Gemcitabin auf die Gesamt IgM- Antikörperbildung im Modell der akuten Herzabstoßung. Die Antikörperproduktion ist sowohl gegenüber dem Ausgangswert als auch gegenüber der betreffenden Kontrollgruppe signifikant supprimiert. Gemzar®-Gruppe: —●—, Kontrollgruppe: ---■--- (dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=5).

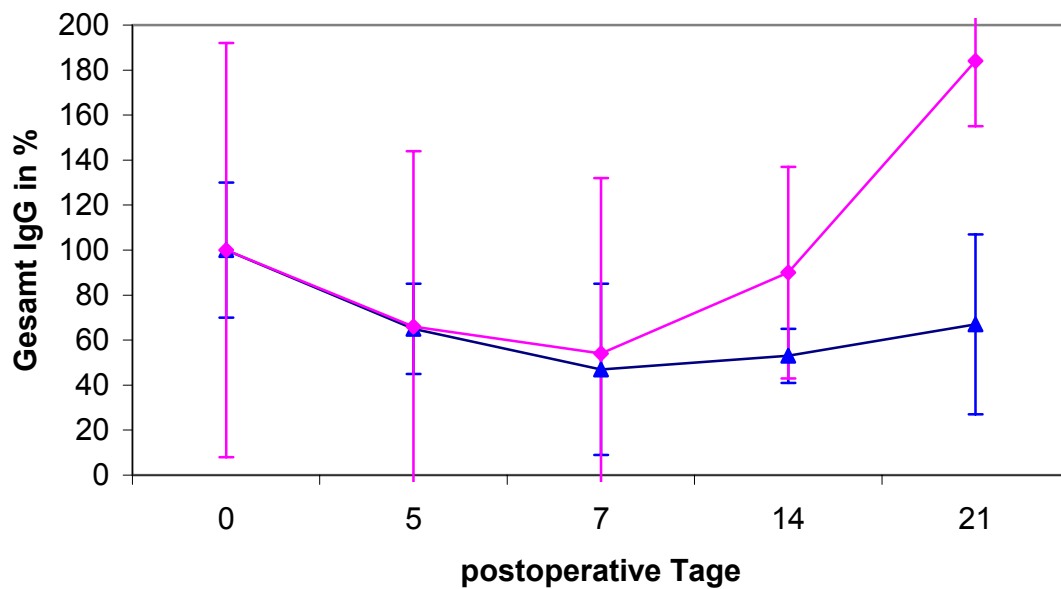


Abb. 19: Einfluss von Gemcitabin auf die Gesamt IgG- Antikörperbildung im Modell der akuten Herzabstoßung. Die Antikörperproduktion ist sowohl gegenüber dem Ausgangswert als auch gegenüber der betreffenden Kontrollgruppe signifikant supprimiert. Gemzar®-Gruppe: —▲—, Kontrollgruppe: ---◆--- (dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=5).

3.6.2 Allospezifische IgM- und IgG-Bestimmung

Um den humoralen Schenkel der Immunantwort nach allogener Ag-Präsentation beurteilen zu können, wurden IgM- und IgG-Antikörper-Spiegelbestimmungen von mit Gemzar® therapierten Nieren- und Herzempfängern durchgeführt.

Im Gegensatz zu dem klassischen Antikörpertiter-Verlauf von IgM (Peak 7.-10. postoperativer Tag) und IgG (Peak 14.-28. postoperativer Tag) war die allospezifische Antikörperantwort in transplantierten und mit Gemcitabin therapierten Tieren komplett inhibiert.

Exemplarisch zeigen wir den Antikörperverschlauf im akuten Herzabstoßungsmodell im Vergleich zur therapierten Gruppe, dargestellt in Abbildung 20 und 21.

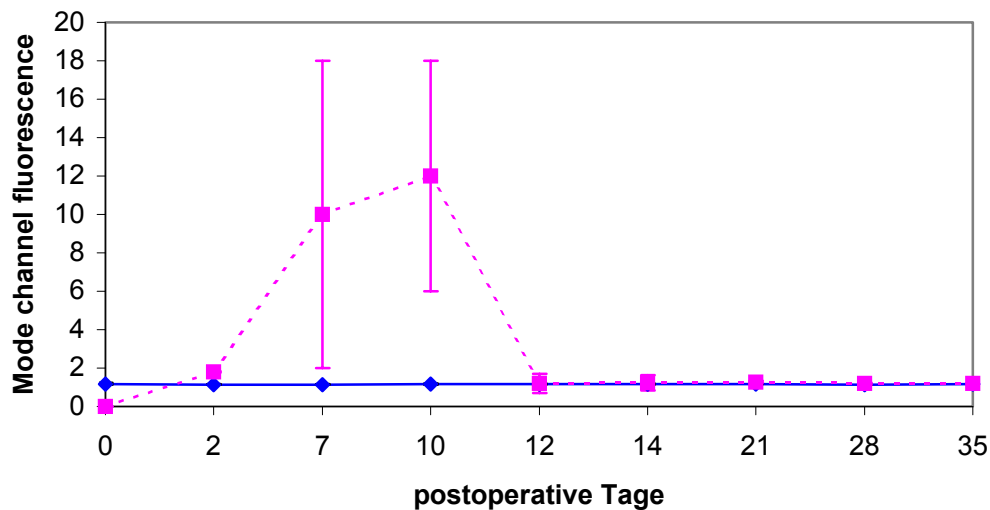


Abb. 20: Durchflusszytometrische allogene IgM-Blutspiegelbestimmung im akuten Herzabstoßungsmodell, therapeutische Gemzar-Dosierung 130 mg/kg Kg/d (dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=8), Gemzar®-Gruppe: —◆—, Kontrollgruppe: - - -■- - -.

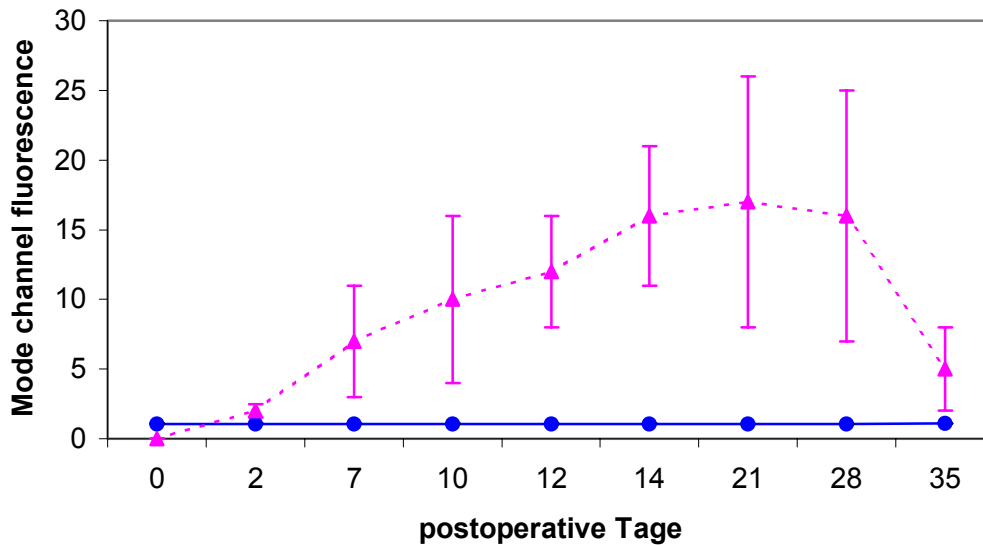


Abb. 21: Durchflusszytometrische allogene IgG-Blutspiegelbestimmung im akuten Herzabstoßungsmodell, therapeutische Gemzar-Dosierung 130 mg/kg Kg/d, (dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=8), Gemzar®-Gruppe: —●—, Kontrollgruppe: ---▲---.

3.6.3 Zytotoxizitätstest

Ob die NK-Zellen des Empfängers eine gesteigerte Lysierungsfähigkeit gegenüber den Lymphzellen des Spenders (Targetzellen) entwickelt haben, konnte nach 4 stündiger Inkubationszeit mit diesem Test eruiert werden. Es zeigte sich eine signifikant ($p < 0,01$) verminderte Aktivität der NK-Zellen in der experimentellen Gruppe.

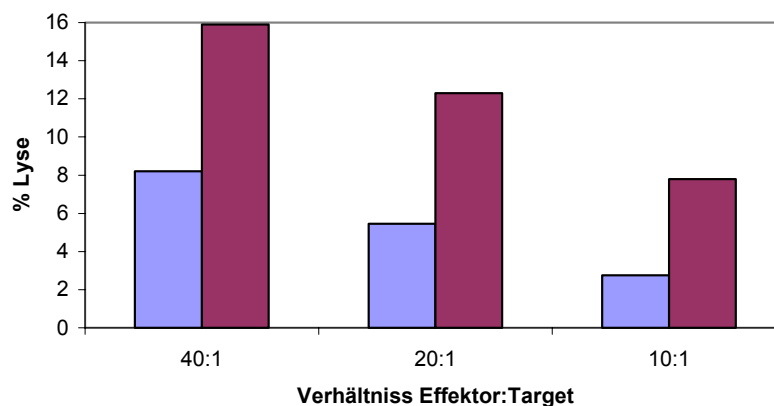


Abb. 22: Zytotoxizitätstest der empfängereigenen NK-Zellen gegen Spender-Lymphozyten von Gemzibatin behandelten Lew-Ratten (blau), welche am 6. postoperativen Tag gewonnen und anschließend mit BN-Target-Zellen inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Lymphknoten-Lymphozyten aus unbehandelten und transplantatabstoßenden LEW-Ratten. (n=4 exp. Gruppe, n=2 Kontrollgruppe)

3.6.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Die Responderzellen für diesen Test wurden aus den zervikalen Lymphknoten nierentransplanterter und mit Gemcitabin immunsupprimierter Lewis-Ratten gewonnen. Mit diesem Test wurde die Proliferationsfähigkeit dieser Zellen in vitro untersucht. Als Bezugswert diente ein nur aus Stimulator- und Responderzellen (transplantiert, ohne Immunsuppression) bestehender Ansatz, dessen Extinktionswert gleich 100 % gesetzt wurde. Ob eine suppressive oder proliferative Fähigkeit der Responderzellen vorlag, konnte man an dem Verhältnis zur Positivkontrolle (100%) ablesen. Eine Modulation im Bereich von 0-50 % bedeutete eine eindeutige suppressive Wirkung, während eine Modulation von über 100 % einer sicheren Zellproliferation entsprach.

Die am 6. Tag nach der Transplantation entnommenen Lymphzellen der Respondergruppe lieferten dabei folgende Ergebnisse:

T i e r	S t i m u l a t i o n s - i n d e x i n %
N 1	2 1
N 2	3 2
N 3	1 7
N 4	1 9

Tab. 16:Stimulationsindex der Lymphozytenpopulation nach 4 tägiger Inkubationszeit.

Die Lymphknotenzellen der mit Gemcitabin behandelten Tiere zeigten eine eindeutige Suppression ihrer proliferativen Fähigkeit.

3.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Der Einfluss von Gemcitabin auf die Expression der intrazellulären Zytokin-Transkripte in den Nierentransplantaten wurde mit der RT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich folgende Häufigkeitsverteilung, angegeben in arbitrary units (AU)/microliter cDNA.

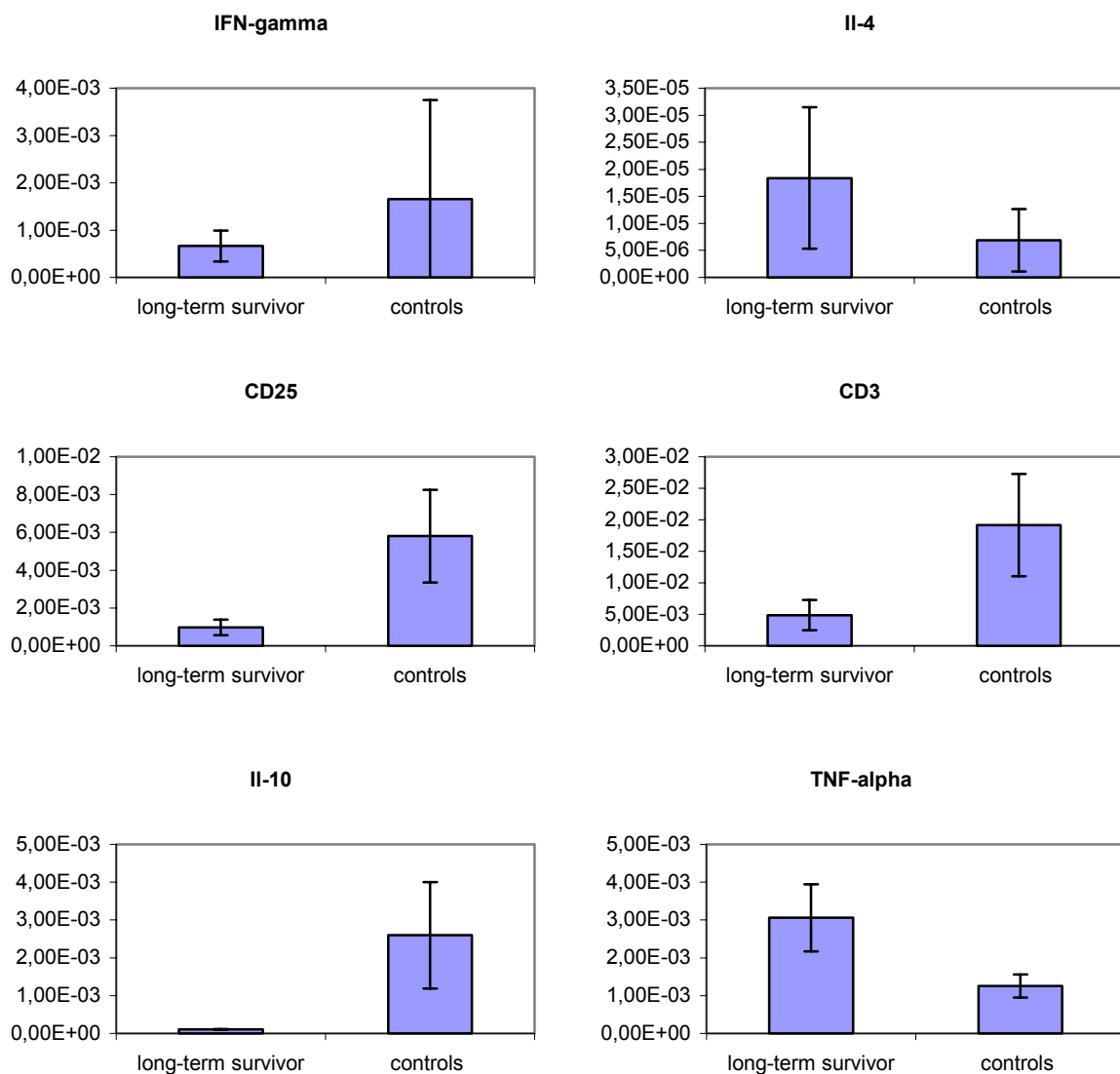


Abb. 23: PCR-Analyse für TNF-alpha, IFN-gamma, IL-4 und -10 sowie CD 3 und CD 10 im Nierengraft. Gezeigt wird die Expressionstärke der mit Gemzar[®] therapierten Nierenempfänger (n=2) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=6), dargestellt als MW±SD.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, die immunsuppressive Wirkung des Nukleosid-Analogons Gemcitabin in verschiedenen perfundierten Organtransplantationsmodellen anhand der akuten und akzelerierten Abstoßung zu untersuchen. Als Modell dienten die allogene Nieren- und Herztransplantation an der Ratte mit nachfolgender Monotherapie durch Gemcitabin. Basierend auf ersten Beobachtungen von MARGREITER et al. (106), der im heterotopen allogenen Herztransplantationsmodell an Ratten zeigen konnte, dass eine Gemcitabin-Behandlung zu einem Langzeitüberleben (>100 Tage) von Herztransplantaten führte, wollten wir in dieser Studie die Wirksamkeit von Gemcitabin in anderen perfundierten Organtransplantationsmodellen evaluieren. Wir konnten eine signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit sowohl im Modell der akuten- (Niere und Herz) als auch in der akzelerierten (Herz) Organabstoßung zeigen. Ferner konnten wir erstmalig den *in vivo*-Einfluss von Gemcitabin auf den humoralen und zellulären Schenkel der Immunantwort im Rahmen einer Transplantation demonstrieren, indem wir zusätzlich die Antikörperspiegel, die Lymphozytenproliferationsfähigkeit und die Zytotoxizität nach allogener Antigen-Präsentation untersuchten.

Als Maßstab für die Wirksamkeit der immunsuppressiven Protokolle diente die Transplantatüberlebenszeit bei allogener Nieren- und Herztransplantation ohne immunsuppressive Behandlung (Kontrollgruppe). Hierbei stießen alle Tiere der entsprechenden Gruppen die Transplantate mit großer Einheitlichkeit im zeitlichen Verlauf (mittlere Transplantatüberlebenszeit: Niere akut d6, Herz akut d7, Herz akzeleriert d1,4) und in Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur ab (89,106,141,148). Die Beurteilung der Abstoßungsreaktion der transplantierten Organe stützte sich auf die klinische Untersuchung und, zur Bestätigung, auf den Befund der Re-Laparotomie und der makroskopischen Inspektion.

Im Modell der akuten Transplantatabstoßung, die hauptsächlich durch zelluläre Reaktionen vermittelt wird, sollte die Transplantatüberlebenszeit durch Gemcitabin-Gabe maximal verlängert werden. Die Lewis / Brown-Norway-Rattenkombination eignet sich aufgrund der genetischen Differenz hierfür besonders gut (62). Entgegen den Ergebnissen von MARGREITER (106) führte die Gemzar[®]-Therapie mit einer Dosierung von 130 µg/kg KG/d in unserem Nierenmodell zu keiner deutlichen Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Mit der Dosierung von 150 µg/kg KG/d zeigte sich eine signifikante Verzögerung der Transplantatabstoßung bei allen Tieren dieser Gruppe. Trotz einheitlicher Ischämiezeit der Transplantate kam es zu unterschiedlichen Überlebenszeiten. Während zwei Tiere nach 30 Tagen unerwartet früh mit abgestoßenen Organen euthanasiert werden mussten, konnte bei zwei Tieren sogar eine unbegrenzte Organtoleranz (>100 Tage) erzielt werden. Die beiden anderen Tiere aus der Gruppe verstarben nach 50 bzw. 57 Tagen und zeigten keine Zeichen einer Abstoßung.

Wie unter 2.5.1. beschrieben, erfolgte die Kontrolle der Nierentransplantate durch Beobachtung der Harnproduktion im Stoffwechselkäfig. Eine gute initiale Harnproduktion konnte bereits intraoperativ während der Ureteranastomosierung festgestellt werden. Eine Oligurie bzw. Anurie konnte dadurch im späteren Verlauf als Zeichen einer stattfindenden Abstoßungsreaktion gesehen werden. Zeigten die Tiere bereits klinisch Auffälligkeiten in Form einer eingeschränkten Diurese, ließ sich eine quantitative Einschränkung der Urinproduktion in Korrelation zur Abstoßungsreaktion feststellen. Bei allen anderen zeigte sich die uneingeschränkte Diurese mit dem makroskopischen Organbefund eines nicht abgestoßenen Transplantates bei der Sektion konform.

Mit dem akuten Herzmodell wollten wir die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse (106) reproduzieren und an dem Modell die Effekte auf die humorale und zelluläre Immunität untersuchen. Bei einer Dosierung von 130 µg/kg KG/d wurden alle Tiere mit guter Transplantatfunktion zwischen dem 21. und 50. postoperativen Tag euntahanasiert. Die Organe wurden anschließend zur histologischen Aufbearbeitung und zur PCR-Analyse asserviert.

Nachdem wir mit dem akuten Modell den Einfluss von Gemcitabin auf die zellulär ablaufende Abstoßungsreaktion untersucht hatten, wollten wir den Effekt in einer antikörpervermittelten Abstoßung testen. Mit Hilfe des von DI STEFANO und KUPIEC-WEGLINSKI entwickelten Modells der akzelerierten Transplantatabstoßung (46) war eine Reproduktion der Immunreaktion des Organempfängers zuverlässig. Durch eine Sensibilisierung der Ratten mit einer Hauttransplantation kommt es nach erneutem Antigenkontakt durch die Organtransplantation innerhalb von 24 bis 36 Stunden zu einer fulminanten humoralen Abstoßung, die auf einer Reaktion von Memory-T-Zellen und B-Lymphozyten basiert. Unmittelbar nach der Transplantation kommt es hier zu einer ausgeprägten Freisetzung von IgM, IgG, C3 und Fibrin sowie zu einer Infiltration des Transplantates mit neutrophilen Granulozyten (46,67). Auch hier konnte eine hoch signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit erzielt werden, indem bei allen Tieren, die mit einer Gemzar[®]-Dosierung von 150 µg/kg KG/d behandelt wurden, ein Transplantatüberleben von 4 bis 6 Tagen induziert werden konnte. Dies ist insofern von großer klinischer Relevanz, da bei vielen Organempfängern durch Bluttransfusionen, Schwangerschaft oder vorherige Transplantationen bereits eine Sensibilisierung stattgefunden haben kann.

Warum es zu den unterschiedlichen Transplantatüberlebenszeiten in der nierentransplantierten Gruppe kam, kann nicht eindeutig eruiert werden. Obwohl aus qualitätssichernden Maßnahmen ausschließlich Tiere in das Protokoll aufgenommen wurden, bei denen eine Ischämiezeit des Transplantates unter 30 Minuten vorlag, könnte ein Grund die durch Ischämie bedingte Urämie sein. GUTTMANN et al. (62) beschrieben am Nierentransplantationsmodell der gleichen Rattenstammkombination variierende Transplantatüberlebenszeiten und sahen den Grund in der unterschiedlichen Ischämiezeit der Transplantate. Die durch eine Schädigung der Nierentubuli ausgelöste Urämie beim Empfängertier führte zu einer unspezifischen Suppression des Immunsystems. Bereits zu Beginn der 50-er Jahre beschrieben LAWLER et al. anhand klinischer Beobachtungen nach humanen Nierentransplantationen gleiche Zusammenhänge (96). Möglicherweise spielt auch der Zeitfaktor zwischen erfolgter Transplantation und dem Erreichen von therapeutischen Wirkspiegeln in der frühen postoperativen Phase eine Rolle.

Wenn dadurch der Gemcitabin-Spiegel in der Effektorphase nicht ausreichend aufgebaut werden konnte, so ließe sich erklären, dass sich die Abstoßungsreaktion zwar noch verzögern, aber nicht mehr vollständig verhindern ließ. Ein Grund für den frühen Tod der beiden anderen Tiere, bei denen die Transplantate makroskopisch keine Abstoßungszeichen zeigten, könnte in der hohen Dosierung von 150 µg/kg KG/d liegen. Auch MARGREITER et al. (106) beschrieben bei einer Dosierung von ≥ 150 µg/kg KG/d einige Nebenwirkungen, wie einen deutlichen Gewichtsverlust von mehr als 10%, Leukopenie oder Pneumonie. Da beide Tiere eine solche Gewichtsabnahme boten und die Transplantate keine Zeichen einer Abstoßung zeigten, lässt sich vermuten, dass der Grund für den plötzlichen Tod der Tiere mit der hohen Applikationsdosis von Gemcitabin einhergeht. Der in der Literatur beschriebene Pruritus oder Hautläsionen (106) fehlten allerdings bei sämtlichen Tieren. In der Gruppe der akzelerierten Abstoßung konnte die Gewichtsabnahme, bei gleicher Gemzar-Dosierung, nicht festgestellt werden. Die Therapie wurde allerdings in dieser Gruppe bereits nach 4-6 Tagen (zum Zeitpunkt der Abstoßung) abgebrochen. In der Gruppe des akuten Herzmodells konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

Das klinische Abstoßungsverhalten des Herzens unterscheidet sich demnach eindeutig von dem der Niere. Wenn man die einzig vorhandenen Fremdergebnisse im Zusammenhang mit dieser Fragestellung (106) mit unseren vergleicht, müssen wir hervorheben, dass für eine Suppression der Immunantwort für die Niere höhere Dosen Gemcitabin notwendig waren, als für das Herz. Während es in der Nierengruppe zu unterschiedlichen Verläufen kam, gestaltete sich der postoperative Verlauf in der Herzgruppe homogen. Dies könnte für ein höheres immunologisches Risiko der Niere sprechen, deckt sich aber nur bedingt mit der Vorgehensweise im humanen Transplantationsmodell. Dort sind die notwendigen Spiegel der Immunsuppressiva in der postoperativen Phase in der Regel bei nierentransplantierten Patienten niedriger zu halten als bei Herzempfängern (66,41).

Nachdem wir die Transplantatüberlebensrate durch die Anwendung von Gemcitabin signifikant verlängern konnten, untersuchten wir den Einfluss auf den humoralen Schenkel der Immunreaktion. Obwohl die akute Abstoßung ein durch T-Zellen bestimmtes Ereignis darstellt, tragen Antikörper auch zur Allograft-Zerstörung bei (155,170).

Diese antikörperabhängige zelluläre Toxizität (ADCC) wird wahrscheinlich durch frühe Interaktionen von allospezifischen Immunglobulinen mit dem Gefäßendothel des Organtransplantates ausgelöst. In der Literatur wurde bei experimentellen akuten Abstoßungsversuchen von hoher anti-Donor ADCC-Aktivität in infiltrierenden Zellen (53) und über eine große Anzahl von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten und Plasmazellen in den Spenderorganen und in der Empfänger-Milz berichtet (28). Die Bedeutung dieser induzierten Antikörper lässt sich durch jüngste Beobachtungen belegen, bei denen spezifische und nicht-spezifische anti-Donor Antikörper aus abgestoßenen Empfänger-Nieren isoliert werden konnten (63). Des weiteren lassen, in der frühen postoperativen Phase diagnostizierte, Gefäß-Läsionen in menschlichen Herztransplantaten ohne Nachweis einer zellulären Infiltration auf einen humoralen Mechanismus schließen (81). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine suffiziente Immunsuppression die Antikörper-Titer im Tierexperiment und im humanen Transplantationsmodell deutlich gesenkt, bzw. ein Anstieg verhindert werden konnte (144,178).

In dem vorliegenden Projekt konnte mit der quantitativen Bestimmung der Antikörper eine signifikante Unterdrückung der Gesamt-IgM- und -IgG-Blutspiegel belegt werden. Durch die Applikation von Gemcitabin konnte nicht nur eine generalisierte Proliferationshemmung der antikörperproduzierenden Zellen erzielt werden. Neben der signifikanten Reduktion der Antikörper-Titer und Verhinderung der „Umschaltung“ der Antikörperproduktion von IgM auf IgG, im akuten Nieren- und Herzmodell, erwies sich der „Gemzar[®]-Effekt“ als so potent, dass auch die hauptsächlich antikörpervermittelte Abstoßung des akzelerierten Modells signifikant supprimiert werden konnte.

Trotz maximaler allogener Stimulation im perfundierten Organmodell konnte durch Gemcitabin eine Reduktion der allospezifischen Antikörper-Level erzielt werden. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich in beiden akuten und in der akzelerierten Abstoßungsgruppe eine signifikante Verminderung der Allo-Antikörper-Titer. Zahlreiche Studien belegen, dass Allo-Antikörper in direktem Zusammenhang mit der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion stehen können (178).

WASOWSKA et al. (177) berichtete 1992 über signifikante Unterschiede in der Allo-Antikörperproduktion nach Nierentransplantation zwischen der Kontrollgruppe und den, durch eine spenderspezifische Bluttransfusion, immunsupprimierten Ratten. Die signifikante Unterdrückung der IgM- und IgG-Allo-Antikörper konnte dabei nicht nur im Serum nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich auch eine deutlich weniger exprimierte Fraktion im Transplantat selbst. Ebenso konnte eine verringerte Produktion durch Splenozyten festgestellt werden. Die Autoren setzten dies in direkten Zusammenhang mit der signifikant verlängerten Transplantatüberlebenszeit der Nierengrafts. KOROM et al. (89) gelang, es den Einfluss der zirkulierenden Allo-Antikörper auf das Transplantatüberleben in einem akuten Herztransplantationsmodell an der Ratte zu demonstrieren. SCHMIDBAUER et al. (148) konnte ebenfalls mit den Ergebnissen eines Rattenmodells belegen, dass eine unterdrückte IgM- und IgG- Produktion mit einer Unterdrückung der akzelerierten Abstoßungsreaktion korreliert. Wird zudem der „Switch“ der Antikörperbildung von IgM auf IgG verhindert, gilt dies als prognostisch günstiges Zeichen für das Transplantatüberleben (177). Dieser starke Effekt auf die humorale Immunantwort wurde kürzlich in einem tierexperimentellen Tumormodell mit Gemzar[®] (124) beschrieben. In dieser Studie zeigte sich, dass Gemcitabin selektiv die humorale Immunreaktion supprimiert, während es die antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort nicht wesentlich beeinflusst.

Wir konnten mit dem MLR-Test allerdings eine deutlich reduzierte Proliferationseigenschaft der am 6. Tag nach der Transplantation entnommenen Lymphknotenzellen von allogenen nierentransplantierten und immunsupprimierten Ratten zeigen. Diese reduzierte Fähigkeit, auf einen allogenen Reiz hin zu proliferieren, könnte mit dem Angriffspunkt von Gemcitabin zusammenhängen. Als Antimetabolit entfaltet Gemcitabin seine Wirkung in der Synthese (S)-Phase der Mitose, in der die DNA-Replikation stattfindet, wodurch die Blastentransformation verhindert wird (138). Neben des „maskierten Einbaus“ in die DNA (1,138) scheint auch der hemmende Einfluss von Gemcitabin auf die Topoisomerase I (140) für die antiproliferative Wirkung verantwortlich zu sein. Ähnliche Ergebnisse konnte auch MARGREITER et al. in einem *in vitro* Versuch zeigen (106).

Um eine komplette Inhibition der T-Lymphozyten-Proliferation in einem Mikrokultur-Agar-System durch Gemcitabin zu erzielen, benötigte er nur die Hälfte der Gemzar[®]-Konzentration wie für die totale Inhibition unreifer Vorläufer-Zellen (106). Die Ursache für diese verminderte Reaktionsfähigkeit lässt sich durch den MLR-Test alleine nicht erklären, da dieser Test, im Gegensatz zum adoptiven Zellentransfer, nicht in der Lage ist, spenderspezifische Suppressorzellen nachzuweisen (173). HUTCHINSON beschreibt eine Differenzierung der aktivierten T-Helferzellen (TH) nach Kontakt mit fremden MHC-Antigen (80). Während die eine Population (TH1) über Bildung von IL-2 und Interferon- γ die Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen spenderspezifischen T-Zellen bewirkt, führt die Ausschüttung von IL-4 und IL-5 durch die TH2-Zelle zu einer Vermehrung der spenderspezifischen T-Suppressorzellen. Diese könnten ebenso die verminderte Proliferationsfähigkeit der Lymphknotenzellen aus unserer experimentellen Gruppe bewirkt haben.

Andere Studien konnten mit *in vitro* Versuchen wiederum die starke Beeinflussung der T-Lymphozyten durch Gemcitabin bestätigen. ALVINO et al (3) beschrieb eine starke Inhibition der durch IL-2 aktivierten Killer-Zellen (LAK) und der Antigen abhängigen zytotoxischen T-Lymphozyten, während ausgereifte Zellen und NK-Zellen nur geringfügig in der Aktivität supprimiert wurden. Eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion des Empfängerorganismus, die zur Transplantaterstörung, bzw. – abstoßung führt, nimmt die durch zytotoxische T- und natürliche Killer – Zellen ausgelöste Form ein. Die Reifung der zytotoxischen T-Zellen vom Vorläufer zur funktionstüchtigen Zelle erfordert das Erkennen der MHC I Moleküle neben der alloenen Antigen-Präsentation und einem zweiten Signal. Dieses kann durch Antigen-präsentierende-Zellen oder durch von T-Helfer-Zellen freigesetzte Zytokine ausgelöst werden (170,171). Die dadurch ausgelöste Kaskade umfasst neben der Erkennung der Zielzellen und deren Lysierung ebenfalls das Entfernen der T-Zellen, so dass diese erneut zur Verfügung stehen können. Die NK-Zellen in der mit Gemcitabin behandelten Tiere zeigten im Zytotoxizitätstest gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich geringere Aktivität, so dass eine Wirkung von Gemcitabin auf die NK-Zellen anzunehmen ist.

Obwohl wir in diesem Projekt ausschließlich die Vermehrungsfähigkeit der Lymphozyten aus zervikalen Lymphknoten untersucht haben, ist das Ergebnis in Hinblick auf die Immunsuppression dennoch eindrucksvoll, da KUPIEC-WEGLINSKI et al. (92) eine starke Beteiligung der Lymphknotenzellen bei der Immunantwort auf einen allogenen Reiz hin beobachten konnten.

Die zugrundeliegenden Testverfahren sind zwar standardisierte Methoden, um präzise eine quantitative Bestimmung der durch Antigene hervorgerufenen Immunreaktion von Lymphozyten durchzuführen (164) bzw. die Aktivität der NK-Zellen zu messen (41), dennoch stellt die Interpretation dieser Alloreaktivitätstests in der klinischen Situation oft ein Problem dar. Es zeigte sich sowohl im Tierexperiment als auch im humanen Modell (4), dass nach Absetzen der Medikation die gängigen Immun-Assays, wie die gemischte Lymphozytenreaktion, der zellvermittelte Zytotoxizitätstest und die limitierte Verdünnungsanalyse für zytotoxische Vorstufen- und Effektorzellen, keine korrekten Ergebnisse für das Bestehen einer spenderspezifischen Nichtreaktivität erbringen. Umgekehrt beweist eine *in vitro* Reaktivität gegen das Transplantat nicht unbedingt eine drohende Abstoßungsreaktion (5).

Die Expression von IFN- γ , CD 3, CD 25 und IL-10 mRNA im Transplantat war in der Kontrollgruppe erheblich gegenüber der Gemcitabin-Gruppe gesteigert. Dagegen zeigte sich in dieser Gruppe eine deutlich erhöhte Gen-Transkription für IL-4 und TNF- α . Dies lässt vermuten, dass der Zell-Synthese-Apparat der entsprechenden Zellen so eingestellt war, dass die jeweiligen Zytokine produziert werden sollten. Obwohl immunhistochemische Untersuchungsmethoden für eine definitive Aussage über den Gehalt der Infiltrate notwendig wären, lässt sich mit diesem PCR-Ergebnis zumindest eine Aussage darüber machen, inwieweit die Zellen auf mRNA-Ebene durch die Gemcitabintherapie inhibiert bzw. angeregt wurden. Ob sie tatsächlich diese Zytokine und Oberflächenantigene synthetisiert hätten und in welcher Menge, kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Allerdings lässt sich sagen, dass unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs und der Ergebnisse unserer *in vitro* Versuche eine Korrelation mit dem PCR-Ergebnis besteht.

CD 25, ein Element des IL-2-Rezeptors, wird im Rahmen der akuten Abstoßung vermehrt exprimiert. Das von den T_H1-Zellen produzierte IFN- γ induziert die Aktivierung, Differenzierung und das Wachstum von Makrophagen, T/B-Zellen und NK-Zellen (169). CD 3 ist als Teil des T-Zell-Rezeptor-Komplexes entscheidend an der T-Zell-Aktivierung beteiligt (169). Eine deutlich Erhöhung dieser Gentranskripte in der Kontrollgruppe korreliert mit dem Verlauf der Abstoßung. IL-4 mRNA wird in der behandelten Gruppe stärker exprimiert. Das Zytokin IL-4 wird hauptsächlich von T_H2-Zellen gebildet und hemmt die durch IL-2 ausgelöste Aktivierung von NK-Zellen und die Proliferation der B-Zellen und wirkt so der Abstoßungsreaktion entgegen. In der zentralen Phase der zellulären Abstoßung überwiegt die T_H1-Population und führt über die Freisetzung der charakteristischen Zytokine mit Rekrutierung weiterer Zellen zu einem toxischen Schaden des umgebenden Gewebes. Eine vermehrte Infiltration mit T_H2-Zellen findet sich häufig bei tolerierten Allogentransplantaten, die dort wahrscheinlich eine Hemmung der T_H1-Zellen bewirken (169). Beide TH-Zellgruppen sind in der Lage, durch die eigenen Zytokine die jeweilige andere Zellgruppe zu inhibieren. Umgekehrt kann sich die entsprechende Subpopulation selbst verstärken, indem beispielsweise IL-2 positiv auf T_H1-Zellen und IL-4 positiv auf T_H2-Zellen wirkt. IL-10 deaktiviert Makrophagen, die Proliferation von T_H1-Lymphozyten sowie die IFN- γ -Produktion und kann somit einer Abstoßungsreaktion entgegen wirken (169). Warum die mRNA-Transkriptexpression dieses Zytokins in der experimentellen Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe so deutlich erniedrigt ist, können wir nicht erklären. Erwartungsgemäß sollte die TNF- α mRNA-Expression in der experimentellen Gruppe ebenfalls erniedrigt sein, um konform mit dem klinischen Verlauf zu sein.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von Gemcitabin als neues Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin analysiert. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen von MARGREITER et al. (106) konnten wir zeigen, dass die Anwendung des Nukleosid-Analogons in verschiedenen perfundierten Organtransplantationsmodellen zu einer signifikanten Reduzierung der Immunreaktion im Empfängerorganismus führt.

Gemcitabin, das im Modell der akuten Nierentransplantation in einer Dosierung von 150 µg/kg KG/d und im akuten Herztransplantationsmodell in einer Dosierung von 130 µg/kg KG/d verwendet wurde, führte in beiden Modellen zu einer signifikanten Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit (vgl. 3.3 und 3.4). Im Modell der akzelerierten Herzabstoßung, konnte die Transplantatstoßung ebenfalls signifikant unterdrückt werden (siehe 3.4), hierbei musste die Dosierung aber auf 150 µg/kg KG/d erhöht werden.

Die Vermutung, dass Gemcitabin sowohl im zellulären (akutes Modell) als auch im humoralen Schenkel (akzeleriertes Modell) der Immunkaskade eingreift, ließ sich durch unsere in vitro Versuche bestätigen. Obwohl mit dem Lymphozytenproliferationstest (MLR) und dem zellvermittelten Zytotoxizitätstest keine definitiven Aussagen über den späteren Verlauf einer Transplantatabstoßung geben werden kann, lässt sich zumindest sagen, dass die Anwendung von Gemcitabin bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Immunreaktion zu einer nachweisbaren Suppression führt.

Wir konnten im Rahmen dieser Untersuchung den genauen Wirkmechanismus von Gemcitabin hinsichtlich der Immunsuppression nicht klären. Bekannt ist, dass Gemcitabin seine Wirkung nur entfalten kann, wenn das Enzym Deoxycytidin-Kinase vorliegt (84). Dieses, für die Phosphorylierung von Gemcitabin geschwindigkeitsbestimmende Enzym, liegt in den Lymphozyten in besonders hoher Konzentration vor (106), was zusammen mit der selbstpotenzierenden Eigenschaft die starke immunsuppressive Fähigkeit bewirken könnte. Deoxycytidin ist das physiologische Substrat für die Deoxycytidin-Kinase und stellt somit einen kompetitiven Inhibitor von Gemcitabin dar. In der Ratte liegt es in einer Konzentration von ca. 5-10 µM/L vor. Da es beim Menschen mit einer Konzentration von weniger als 0,5 µM/L kaum nachweisbar ist, würden wahrscheinlich wesentlich geringere Dosen Gemcitabin ausreichen, um eine gleichwertige Immunsuppression hervorzurufen (131). Als Zytostatikum wird Gemcitabin beim Menschen einmal wöchentlich in einer Dosierung von 30 mg/kg, bzw. 1000 mg/m² für die Dauer von 3-7 Wochen (je nach Tumorart) i.v. verabreicht (84). Anschließend sollte eine therapiefreie Woche eingehalten werden, bevor mit dem Folgezyklus begonnen wird. Mit einer Plasmahalbwertszeit von 11-26 Minuten und einer intrazellulären Halbwertszeit von 5-19 Stunden würde sich diese Darreichungsform für den Einsatz als Basisimmunsuppressivum in der Transplantationschirurgie nicht eignen.

Die Mechanismen der Selbstpotenzierung führen nach Einmalgabe zu einer sehr hohen intrazellulären Akkumulation und prolongierten Retention (71). Bisher gibt es keine Daten, wie sich die Akkumulation nach täglicher low-dose Applikation verhält.

Aufgrund der guten Organverträglichkeit von Gemcitabin (39,60) sowie den Ergebnissen aus dieser Studie und der von MARGREITER et al. (106), wäre der Einsatz von Gemcitabin als Immunsuppressivum in der Organtransplantation aber durchaus denkbar. Ähnlich wie die anderen Antimetabolite, die in der Transplantationsimmunologie eingesetzt werden (vgl. Abschnitt 1.1.3 und Tab. 1), könnte Gemzar® in der Kombinationstherapie mit Cyclosporin A seine Anwendung finden. Ebenso wäre der Gebrauch im Rahmen einer steroidrefraktären Abstoßungsreaktion als sogenanntes „Rescue-Mittel“ vorstellbar.

Studien über mögliche synergistische oder potenzierende Eigenschaften in der Kombination mit anderen Immunsuppressiva sind in Vorbereitung. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um den genauen Wirkmechanismus von Gemzar® im Rahmen der Transplantatabstoßung aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Das Nukleosid-Analogon Gemcitabin (Gemzar[®]), bisher nur als Zytostatikum gegen eine Vielzahl von Tumoren verwendet, konnte in der vorliegenden Studie erfolgreich als potentes immunsuppressives Medikament im Rahmen einer akuten und akzelerierten Transplantatabstoßung im Rattenmodell eingesetzt werden.

In der Dosierung von 130-150 µg/kg KG/d unterdrückte Gemzar[®] die akute und akzelerierte Abstoßung von allogenen (LBNF₁→LEW) Nieren- und Herztransplantaten signifikant gegenüber der nicht behandelten Gruppe (Transplantatüberlebenszeiten: akut Niere 68,17±42,99 vs. 5,9±0,64 p<0,005; akut Herz 32,13±15,37 vs. 7±0,63 p<0,003; akzeleriert Herz 5±1 vs. 1,39±0,13 p<0,001).

In vitro konnten die durch allogene Antigene ausgelöste Proliferation der Lymphozyten im MLR-Test in der mit Gemcitabin behandelten Gruppe deutlich herabgesetzt werden. Durch Zytotoxizitätstest, radiale Immundiffusion und FACS-Analyse war es möglich, eine Inhibition der durch NK-Zellen ausgelösten Zell-Lyse, eine verminderte Produktion der Gesamt-Immunglobuline sowie die vollständige Abrogation allospezifischer IgM- und IgG-Antikörper in der experimentellen Gruppe zu zeigen. Innerhalb der physiologischen Zeitspanne einer akuten Transplantatabstoßung konnte durch die PCR-Analyse gezeigt werden, dass mit Gemcitabin die mRNA-Transkriptexpression innerhalb des Transplantates von IFN-γ, CD 3 und CD 25 im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert wird.

Die Ergebnisse aus dieser Studie versprechen eine weitere Einsatzmöglichkeit des Zytostatikums Gemcitabin im Rahmen immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantation. Weitere Studien, insbesondere zur Dosisoptimierung und zur Anwendung in der Kombinationstherapie sind erforderlich und in Vorbereitung.

Literaturverzeichnis

- 1 Abbruzzese JL
Phase I Studies with the novel nucleoside analog Gemcitabine.
Seminars in Oncology 23, 5 Suppl 10: 25-31 (1996)
- 2 Alexandre GPJ, Wonigeit K, Bunzendahl H
Immunsuppression.
in PICHLMAYR R (Hrsg): Transplantationschirurgie, Springer Verlag Berlin,
Heidelberg, New York: 205-234 (1981)
- 3 Alvino E, Fuggetta MP, Tricarico M and Bonmassar E
2',2'-Difluorodeoxycytidine: in vitro effects on cell-mediated immune
response.
Anticancer Res. 18: 3597-3602 (1998)
- 4 Andersson LC and Hayry P
Clonal isolation of alloantigen-reactive T cells and characterization of their
memory functions.
Transplant Rev 25: 121-162 (1975)
- 5 Andersson LC and Hayry P
Generation of memory T cells in one-way mixed lymphocyte culture.
Scand J Immunol 3: 461-469 (1974)
- 6 Azuma H, Tilney NL
Chronic graft rejection.
Curr Opin Immunol 6: 770 (1994)
- 7 Barnard CN
A human cardiac transplant: An intern report of a successful operation
performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town.
S Afr Med J 41 : 1271-1274 (1967)
- 8 Barros EJG, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N
Glomerular hemodynamics and hormonal participation on Cyclosporine
nephrotoxicity.
Kidney Int 32: 19 (1987)
- 9 Barry JM
Procurement and preservation of cadaver kidneys.
Urol Clin N Am 10: 205-216 (1983)
- 10 Barry JM
Immunosuppressive drugs in renal transplantation-a review of the regimes.
Drugs 44: 554-566 (1992)

-
- 11 Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE
24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys.
Lancett II: 536-539 (1967)
 - 12 Belzer FO, Southard JH
Principles of solid organ preservation by cold storage.
Transplantation 45: 673-676 (1988)
 - 13 Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB
Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits.
Br Med J 1: 1157 (1951)
 - 14 Binder J, Lehmann M, Graser E, Hancock WW, Watschinger B, Onodera K, Sayegh MH, Volk HD et al.
The effects of nondepleting CD4 target therapy in presensitized rat recipients of cardiac.
Transplantation 61: 804-811 (1996)
 - 15 Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Staehelin H
Biological effects of Cyclosporin A: A new antilymphocytic agent.
Agents Actions 6: 468 (1976)
 - 16 Borel JF, Feurer C, Magnée C, Staehelin H
Effects of the new anti-lymphocytic peptide Cyclosporin A in animals.
Immunology 32: 1017 (1977)
 - 17 Borel JF, Kis ZL
The discovery and development of Cyclosporine (Sandimmune).
Transplant Proc 23: 1867-1874 (1991)
 - 18 Bush WW, Bartucci M, Cupples SA
Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression.
AACN Clin Issues. 1999 May;10(2):253-269
 - 19 Calne RY
The development of immunosuppression in organ transplantation.
in: Progress in Transplantation 1, Eds: Morris PJ, Tilney NL, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, NY (1984)
 - 20 Calne RY
Immunosuppression for organ grafting.
Transplant Proc 24: 1260-1262 (1992)

-
- 21 Calne RY, Collier DS, Lim S
Rapamycin for immunosuppression in organ allografting.
Lancet 2: 227 (1989)
- 22 Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Brown FL
Renal preservation by ice-cooling.
Brit Med J 2: 651-655 (1963)
- 23 Calne RY, Thiru S, Mc Master P, Craddock GN, White DJG, Evans DB, Dunn DC, Pentlow PD, Rolles K
Cyclosporin A in patients receiving renal allograft from cadaver donors.
Lancet II: 1323-1327 (1978)
- 24 Carrel A
Succesfull transplantation of both kidneys from a dog into a bitch with removal of both kidneys from the latter.
Science 23: 394 (1906)
- 25 Carrel A
Transplantation in mass of the kidneys.
J Exp Med 10: 98 (1908)
- 26 Carrel A, Guthrie CC
The transplantation of veins and organs.
Am Med 10: 1101 (1905)
- 27 Charpentier B, Hiesse C, Durrbach A, Ammor M, von Ey F, Kechrid C and Kriaa F
Overview of Clinical trials with new agents.
Transplantation Proceedings 33: 2201-2203 (2001)
- 28 Cheigh JS, Mouradian J, Soliman M, Tapia L, Riggio RR, Stenzel KH and Rubin AL
Focal segmental glomerulosclerosis in renal transplants.
Am J Kidney Dis 2: 449-455 (1983)
- 29 Chong ASF, Gebel H, Finnegan A, Petraitis EE, Jiang XL, Sankary HN, Foster P, Williams JW
Leflunomide, a novel immunomodulatory agent: in vitro analyses of the mechanism of immunosuppression.
Transplant Proc 25: 747-749 (1993)
- 30 Collaborative Transplant Study
Transplantationsstatistik Deutschland 1985-1999.
CTS Daten (2001)

-
- 31 Collaborative Transplant Study
First Kidney Transplants 1985-2000.
CTS Daten Dezember (2001)
- 32 Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI
Kidney preservation for transportation.
Lancet II: 1219-1922 (1969)
- 33 Condie RM, Waskosky KE, Hall BL, Jonasson O, Mozes MF, Novick AC, Jarrell BE, Lee D et al.
Efficacy of Minnesota antilymphoblast globulin in renal transplantation: A multicenter, placebo-controlled, prospective, randomized, double-blind study.
Transpl. Proc 17: 1304-1311 (1985)
- 34 Cooley DA, Bloodwell RD, Hallman GL, Nora JJ
Transplantation of the human heart. Report of four cases.
JAMA 12;205(7): 479-486 (1968)
- 35 Cooper DKC, Nowitzky D
Surgical technique of orthotopic heart transplantation.
In: Cooper DKC, Nowitzky D (Hrsg.): The transplantation and replacement of the thoracic organs.
Kluwer, Dordrecht-Boston-London (1990)
- 36 Cosimi AB
The clinical usefulness of antilymphocyte antibodies.
Transplant Proc 15: 583 (1983)
- 37 Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, La Quaglia MP, Tolkoff-Rubin N, Rubin R
Treatment of acute renal allograft rejection with OKT 3 monoclonal antibody.
Transplantation 32: 535 (1981)
- 38 Cramer DV, Chapman FA, Makowka L
The use of Brequinar sodium for transplantation.
Ann N Y Acad Sci 696: 216-226 (1993)
- 39 Dalkeler T, Mass K, Hartmann T et al.
Weekly short infusions of gemcitabine are not associated with suppression of lymphatic in patients with solid tumors.
Anti Cancer Drugs 8: 643 (1997)
- 40 Dallmann MJ
Cytokines as mediators of organ graft rejection and tolerance.
Curr Opin Immunol 5: 788 (1993)

-
- 41 Decker T and Lohmann-Matthes ML
A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity.
J Immunol. Meth. 115: 61 (1988)
- 42 Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, Banner B, Zerbe T, Sysyn G, Starzl TE
Pathologic observations in human allograft recipients treated with Fk 506.
Transplant Proc 22: 25-34 (1990)
- 43 Demikhov VP
Experimental transplantation of vital organs.
Consultants Bureau, New York (1962)
- 44 Dempster WJ, Lennox B, Boag JW
Prolongation of survival of skin homotransplants in the rabbit by irradiation of the host.
Br J Exp Pathol 31: 670 (1950)
- 45 Deng MC, Angermann CE, Beyersdorf F et al.
Indikationen, Kontraindikationen und differentialtherapeutische Alternativen der Herztransplantation. Derzeitiger Stand und Ergebnisse einer Umfrage bei deutschen Transplantationsprogrammen.
Z Kardiol 85: 519 (1996)
- 46 Di Stefano R, Kupiec-Weglinski JW, Uhteg LC, et al.
Modulation of accelerated rat cardiac allograft rejection by cyclosporine and ART-18.
Transplantation Proceedings 20: 217 (1988)
- 47 Dorling A and Lechler RI
The passenger leukocyte, dendritic cell and antigen-presenting cell (APC).
In: Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects, pp. 355-379,
Eds: Tilney NL, Strom TB, and Paul LC; Lippincott-Raven Publishers,
Philadelphia (1996)
- 48 Dreikorn K
Organkonservierung
Zbl Chir 117: 642-647 (1992)
- 49 Druml W.
The beginning of organ transplantation: Emerich Ullmann (1861-1937).
Wien Klin Wochenschr Feb 28;114(4): 128-137 (2002)

-
- 50 Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH
Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin.
J Immunol 144: 251 (1990)
- 51 Eardley I
Management of ureteric injury.
in Calne R und Pollard SG (Hrsg): Operative Surgery, Gower Medical Publishing London, New York: 11.44-11.46 (1992)
- 52 Eidelmann BH, Abu-Elmagd K, Wilson J, Fung JJ, Alessiani M, Jain A, Takaya S, Todo SN, Tzakis A, Van
Neurologic complication of FK 506.
Transplant Proc 23: 3175-3178 (1991)
- 53 Ettenger RB, Heuser ET, Malekzadeh MH, Pennisi AJ, Uittenbogaart CM and Finer RN
Focal glomerulosclerosis in renal allografts: association with the nephrotic syndrome and chronic rejection.
Am J Dis Child 131: 1347-1352 (1977)
- 54 Falhey JL, Mc Kelvey EM
Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates.
J. Immunol. 94: 84-90 (1965)
- 55 Franksson C
Survival of homografts of skin in rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct.
Lancet I: 1331-1332 (1964)
- 56 Frei U, Brunkhorst R, Schindler R, Bode U, Pichlmayr R, Koch KM
Present status of kidney transplantation.
Clinic Nephrol 38: 46-52 (1992)
- 57 Fung JJ, Thomson AW, Pinna A, Selby RR, Starzl TE
State of immunosuppressive agents in organ transplantation.
Transplant Proc 24: 2372-2374 (1992)
- 58 Gibson T
The fate of skin homografts in man.
J Anat 77: 229 (1943)
- 59 Gill TJ, Kunz HW, Misra DN, Hasset ALC
The major histocompatibility complex of the rat.
Transplantation 43: 773 (1987)

-
- 60 Green MR
Gemcitabine safety overview.
Semin Oncol 23, 5 Suppl 10: 32-35 (1996)
- 61 Groth CG, Ohlmann S, Gannedahl G, Ericzon BG
New immunosuppressive drugs in transplantation.
Transplant. Proc 25: 268-283 (1993)
- 62 Guttman RD
In vitro correlates of rejection. III. Immunologic models for the study of a variety of kidney and heart transplant rejection and prolongation phenomena.
Transplant. Proc. 10: 361 (1978)
- 63 Habib R, Zurowska A, Hinglais N, Gubler MC, Antignac C, Niaudet P, Broyer M and Gagnadoux MF
A specific glomerular lesion of the graft: allograft glomerulopathy.
Kidney Int 44: 5104-5111 (1993)
- 64 Hall BM, Dorsch SE
Cells mediating allograft rejection.
Immunological Rev 77: 31 (1984)
- 65 Hall BM, Jelbart ME, Dorsch SE
Suppressor T cells in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with Cyclosporine.
Transplantation 37: 595 (1984)
- 66 Hammer C
Immunreaktion und Immunsuppression bei Transplantationspatienten.
Intensiv 3: 16 (1995)
- 67 Hancock WW, Di Stefano R, Braun P, Schweitzer RT, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW
Cyclosporine A and anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody therapy in rats suppress accelerated rejection of cardiac allograft through different effector mechanisms.
Transplantation 48: 416-421 (1990)
- 68 Hancock WW, Lord RH, Colby AJ, Diamantstein T, Rickles FR, Dijkstra C, Hogg N, Tilney NL
Identification of IL 2R+ T cells and macrophages within rejecting rat cardiac allografts and comparison of the effects of treatment with anti IL-2 R monoclonal antibody or cyclosporin.
J Immunol 138: 164-170 (1987)

-
- 69 Hardy JD
The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964).
Transplant Proc. 31(1-2): 25-29 (1999)
- 70 Hävry P, Von Willebrand E, Partenais E
The inflammatory mechanisms of allograft rejection.
Immunological Reviews 77: 85 (1984)
- 71 Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W.
Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine.
Cancer Res. 48: 4024-4031 (1988)
- 72 Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB
Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine.
Cancer Res Jul 15;50(14):4417-22 (1990)
- 73 Hess Ad, Tutschka PJ, Santos GW
Effect of Cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro.
J Immunol 126: 961 (1981)
- 74 Hiesse C, Charpentier B, Fries D
Safety of triple immunosuppressive treatment (cyclosporine, azathioprine, prednisolone).
Lancet II: 1355 (1985)
- 75 Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, et al.
The Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: Seventeenth Official Report-2000.
J Heart Lung Transplant 19: 909 (2000)
- 76 Huland H, Conrad S
Transplantation.
in Schumpelick (Hrsg.) Chirurgie: 327-352, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1999)
- 77 Huland H, Klosterhalfen H
Pathomechanismus, Morphologie, Diagnostik und Therapie der Abstoßung transplanterter Nieren.
Urologe, A, 21: 265-273 (1982)
- 78 Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW
Experiences with renal homotransplantation in the human: Report of nine cases.
J Clin Invest 34: 327 (1955)

-
- 79 Hutchinson IF, Shadur CH, Duarte JSA, Strom TB, Tilney NL
Cyclosporin A spares selectively lymphocytes with donor-specific suppressor characteristics.
Transplantation 32: 210 (1981)
- 80 Hutchinson IV
Effector mechanisms in transplant rejection - An overview.
In: Rose ML, Yacoub MH: Immunology of heart and lung transplantation: 2-21
- 81 Isoniemi HM, Kogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Hayry P
Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts.
Kidney Int 41: 155-160 (1996)
- 82 Jackson NM, O'Connor RP, Humes HD
Interactions of Cyclosporine with renal proximal tubule cells and cellular membranes.
Transplantation 46: 109 (1988)
- 83 Kallerhof M, Weigel TF, Isemer FE
Ergebnisse der Nierenfunktion nach Transplantation bei Protektion mit der Euro-Collins-Lösung, der UW oder der HTK-Lösung.
Akt Urol 22: 310-314 (1991)
- 84 Kaye SB
Gemcitabine: Current status of Phase I and II Trials.
Journal of Clinical Oncology 12: 1527-1531 (1994)
- 85 Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC
Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy.
Surgery 61(6): 827-37 (1967)
- 86 Khanna A, Li B, Stenzel KH, Suthanthiran M
Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine.
Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth.
Transplantation 57: 577-582 (1994)
- 87 Kiziroglu F, Miller RG
Effect of Cyclosporine on secondary cytotoxic T lymphocyte responses.
Transplantation 49: 961-65 (1990)
- 88 Korom S
CD 26/Dipeptidylpeptidase IV in allograft rejection.
Habilitationsschrift PD Dr. med. S. Korom: 25 (1999)

-
- 89 Korom S, De Meester I, Schmidbauer G, Pratschke J, Brendel MD, Durinx C, Schwemmler K et al.
Specific Inhibition of CD 26/DPP IV Enzymatic Activity in Allograft Recipients: Effects on Humoral Immunity
Transplant Proc. 31: 778 (1999)
- 90 Korzeniewski C and Callewaert DM
An enzyme-release assay for natural cytotoxicity.
J. Immunol. Meth. 64: 313-320 (1983)
- 91 Kozaki K, Kozaki M, Nagao T
Usefulness of 15-deoxyspergualin for rejection in renal transplantation.
Transplant. Proc 31: 1138 (1999)
- 92 Kupiec-Weglinski JW, De Sousa M, Tilney NL
The importance of lymphocyte migration patterns in experimental organ transplantation.
Transplantation 40: 1-6 (1985)
- 93 Kupiec-Weglinski JW, Filho MA, Strom TB, Tilney NL
Sparing of suppressor cells: a critical action of cyclosporine.
Transplantation 38: 97-101 (1984)
- 94 Küss R, Teinturier J, Milliez P
Quelques essais de greffe de rein chez l'homme.
Mém Acad de chir 77: 755 (1951)
- 95 Largadier F
Immunosuppressive Therapie
in: Largadier F (Hrsg.): Checkliste Organtransplantation. Thieme, Stuttgart-New York, 2. Auflage (1999)
- 96 Lawler RH, West JW, McNulty PH, Clancy EJ, Murphy RP
Homotransplantation of the kidney in the human.
J Am Med Ass 144: 844 (1950)
- 97 Lee S
Kidney Transplantation
in Experimental Microsurgery, Chapter 13: kidney Transplantation: 183-212, Igaku-Shoin New York, Tokyo (1987)
- 98 Lillehei RC et al.
Transplantation of stomach, intestine and pancreas: Experimental and clinical observations.
Surgery 62: 721 (1967)

-
- 99 Lower RR, Shumway NE
Studies on orthotopic homotransplantation of the canine heart.
Surg Forum 11: 18 (1960)
- 100 Lowry RP, Shumway NE
The nonessential role of a humoral antibody response in acute rat cardiac allograft rejection.
Transplantation 37: 182-187 (1984)
- 101 Lund B, Kristjansen PEG, Hansen HH
Clinical and preclinical activity of 2', 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine).
Cancer Treat Rev 19: 45-55 (1993)
- 102 Mancini G, Carbonara AO and Heremans JF
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2: 235-254 (1965)
- 103 Mann FC, Priestley JT, Markowitz J, Yater WM
Transplantation of the intact mammalian heart.
Arch Surg 26: 219-224 (1933)
- 104 Margreiter R
Impact of Cyclosporine on organ transplantation.
Transplant Proc 23: 2180-2182 (1991)
- 105 Margreiter R
Transplantation - how it all began.
Wiener klinische Wochenschrift 114 (4): 123-125 (2002)
- 106 Margreiter R, Fischer M, Roberts K, Schmid T, Hittmaier A, Schirmer M, Geisen F et al.
Gemcitabine - a novel immunosuppressive agent - prevents rejection in a rat cardiac transplantation model.
Transplantation 68: 1051-1053 (1999)
- 107 Mason DW
Effector mechanisms in allograft rejection.
Ann Rev Immunol 4: 119 (1986)
- 108 Matas AJ, Tellis VA, Quinn T, Glichlick D, Sobermann R, Weiss R, Karwa G, Veith FJ
ALG treatment of steroid-resistant rejection in patients receiving cyclosporine.
Transplantation 41: 579-583 (1986)
- 109 Mayer AD, Dimitrewski J, Squifflet JP et al.
Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK 506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: A report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group.
Transplantation 64: 436-443 (1997)

-
- 110 Medawar PB
The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits.
J Anat 78: 176 (1944)
- 111 Medawar PB
A second study of the behavior and fate of skin homografts in rabbits.
J Anat 79: 157 (1945)
- 112 Meyer-Lehnert H
Chronische Niereninsuffizienz.
Internist 33: W99-W111 (1992)
- 113 Miller LW, Kubo SH, Young JB, Stevenson LW, Loh E, Costanzo MR
Report of the consensus conference on candidate selection for Heart Transplantation-1993.
J Heart Lung Transplant. May-Jun;14(3):562-71. Review. (1995)
- 114 Möller E
Areas for further experimentation to elucidate the immunosuppressive activity of cyclosporine.
Transplantation 46(suppl.): 20-23 (1988)
- 115 Morris RE
Rapamycins: antifugal, antitumor, antiproliferative and immunosuppressive macrolides.
Transplant Rev 6: 39 (1992)
- 116 Müller M et al.
Herztransplantation.
In: Müller M et al., Chirurgie für Studium und Praxis: 127, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach (2002/3)
- 117 Müller M, et al.
Nierentransplantation.
In: Müller M et al., Chirurgie für Studium und Praxis: 263, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach (2002/3)
- 118 Müller-Ruchtholtz W
Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen.
in SCHLEGEL B(Hrsg):Verahndlungen der Dt. Gesellsch. F.Inn. Med. J.F. Bergmann Verlag, München: 1455-1460 (1979)
- 119 Murase N, Kim DG, Todo S, Cramer DV, Fung JJ, Starzl TE
FK 506 suppression of heart and liver allograft rejection II. the induction of graft acceptance in
Transplantation 50: 793 (1990)

-
- 120 Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy JB, Alexandre GW, Harrison JH
Kidney transplantation in modified recipients.
Ann Surg 156: 337-355 (1962)
- 121 Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy JB, Walter CW, Brooke MS,
Wilson ME
Study on transplantation immunity after total body irradiation: clinical and
experimental investigation.
Surgery 48: 272-283 (1960)
- 122 Norman DJ
Antilymphocyte antibodies in the treatment of allograft rejection: targets,
mechanisms of action, monitoring and efficacy.
Semin Nephrol 12: 315-324 (1992)
- 123 Norman DJ, Barry JM, Bennett WM, Leone M, Henell K, Funnell B et al.
The use of OKT 3 in cadaveric renal transplantation for rejection that is
unresponsive to conventional anti-rejection therapy.
Am J Kidney Dis 11: 90-93 (1988)
- 124 Nowak AK, Robinson BWS and Lake RA
Gemcitabine Exerts a Selective Effect on the Humoral Immune Response:
Implications for Combination Chemo-immunotherapy.
Cancer Research, April 15, 62: 2353-2358 (2002)
- 125 Ono K, Lindsay ES
Improved technique of heart transplantation in rats.
J Thorac Cardiovasc Surg 57: 225-229 (1969)
- 126 Oudot J
Transplantation rénale.
Presse méd 56: 319 (1948)
- 127 Padberg W, Schwemmler K, Dobroschke J, Kupiec-Weglinski JW, Tilney NL
Immunosuppressive Therapie in der Transplantationschirurgie.
DMW 112: 1670-1674 (1987)
- 128 Paul LC
Overview of Side Effects of immunosuppressive Therapy.
Transplant Proc 33: 2089-2091 (2002)
- 129 Pegg DE
Organ preservation.
Surg Clin N Am 66: 617-632 (1986)

-
- 130 Petritsch PH, Vilitis M, Rauchenwald M, Colombo TH, Breinl E, Hecht W, Altziebler S, Pummer K,
Nierentransplantation.
Acta Chir Austriaca 26: 23-27 (1994)
- 131 Petzer AL, Bilgeri R, Zilian U, et al.
Inhibitory effect of 2-chlorodeoxy-adenosine on granulocytic, erythroid and T-lymphocytic colony.
Blood 78: 2583 (1991)
- 132 Pfitzmann R, Hummel M
Immunsuppressionstherapie und Abstoßungstherapie.
in Pfitzmann, Neuhaus, Hetzer (Hrsg.): Organtransplantation: 23-29,
de Gruyter-Verlag, Berlin New-York (2001)
- 133 Pfitzmann R, Hummel M, Hetzer R
Herztransplantation.
In: Pfitzmann, Neuhaus, Hetzer (Hrsg.): Organtransplantation: 83, de Gruyter-Verlag, Berlin-New York (2001)
- 134 Pichlmayer R
Derzeitige Indikationen zur Nieren-, Pankreas- und Lebertransplantation.
Chirurg 59: 454-458 (1988)
- 135 Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH et al.
A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation.
Transplantation 63: 977-983 (1997)
- 136 Platz KP, Sollinger HW, Hullet DA, Eckhoff DE, Eugui EM, Allsion AC
RS-61443 - a new potent immunosuppressive agent.
Transplantation 51: 27-31 (1991)
- 137 Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO
Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution.
Transplantation 46: 191-196 (1988)
- 138 Plunkett W, Huang P and Gandhi V
Gemcitabine: Preclinical Pharmacology and Mechanisms of Action.
Seminars in Oncology 23, 5 Suppl 10: 3-15 (1996)
- 139 Pollard SG
Renal transplantation and allograft nephrectomy.
in Calne R und Pollard SG (Hrsg): Operative Surgery Gower Medical Publishing, London, New York 11.61-11.67 (1992)

-
- 140 Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT et al.
Gemcitabine (2',2'-Difluoro-2'-Deoxycytidine), an Antimetabolite That Poisons Topoisomerase I.
Clinical Cancer Research 8: 2499-2505 (2002)
- 141 Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, Vergopoulos A, Laskowski I, Shaw GD, Tullius SG et al.
Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor.
Ann Surg Dec;234(6): 732-740 (2001)
- 142 Reem GH, Cook LA, Vilcek J
Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by Cyclosporin A.
Science 221: 63-65 (1983)
- 143 Reitz BA, Hunt SA, Gaudiani V
Clinical heart-lung transplantation.
Transplant. Proc. 15: 1256 (1983)
- 144 Russel PS, Chase CM, Colvin RB
Alloantibody- and T cell-mediated immunity in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis: lack of progression to sclerotic lesions in B cell-deficient mice.
Transplantation 64: 1531-1536 (1997)
- 145 Russmann E et al.
Colloquium Roche Molecular Biochemicals 4:1-4 (1993)
- 146 Scheld HH, Deng MC, Hammel D
Leitfaden Herztransplantation.
Steinkopf, Darmstadt (1997)
- 147 Schmid C, Binder J, Heemann U, Tilney NL
Successful heterotopic heart transplantation in rat.
Microsurgery 15: 279-281(1994)
- 148 Schmidbauer G, Kuenzel J, Homeyer A, Schwemmle K
Donor treatment improves survival of rat cardiac allografts in sensitized recipients.
Transplant Proc 34(5): 1477
- 149 Schmouder RL
Immunosuppressive Therapies for the Twenty-First Century.
Transplant. Proc. 32: 1463-1467 (2000)

-
- 150 Schreiber SL
Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways.
Cell 70: 365-368 (1992)
- 151 Schreiber SL, Crabtree GR
The mechanism of action of Cyclosporin A and FK 506.
Immunol Today 13: 136-142 (1992)
- 152 Schumacher K, Gross R
Immunosuppressive Therapie.
Internist 25: 51-59 (1984)
- 153 Schwilden ED
Technik der Fadenrotation.
Allgemeine Gefäßchirurgische Techniken, 6. unveränd. Aufl.-München:
Impra-Medica: 26 (1997)
- 154 Shevach EM
The effects of Cyclosporin A on the immune system.
Ann. Rev. Immunol. 3: 397-423 (1985)
- 155 Sibley RK
Pathology and Immunopathology of solid Organ Graft Rejection.
Transplant Proc 21 (1): 14-17 (1989)
- 156 Siegling A, Lehmann M, Platzner C, Emmrich F and Volk HD
A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of
cytokine gene expression in rats.
J Immunol Methods 177: 23-28 (1994)
- 157 Sigal NH, Lin CS, Siekierka JJ
Inhibition of human T-cells activation by FK 506, Rapamycin and Cyclosporin
A.
Transplant Proc 23: 1-5 (1991)
- 158 Starzl TE, Brettschneider L, Groth CG
Liver transplantation.
Bull Soc Int Chir Sep;26(5): 474-488 (1967)
- 159 Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GPJ
Liver transplantation with use of Cyclosporine A and Prednisone.
N Engl J Med 305: 266 (1981)
- 160 Starzl TE, Marchioro TL, Talmage DW, Waddell WR
Splenectomy and thymectomy in human renal homotransplantation.
Proc Soc Exp Biol Med 113: 929-932 (1963)

-
- 161 Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA, Iwasaki Y, Cerilli GJ
The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver
homotransplantation and in human renal homotransplantation.
Surg Gynecol Obstet 124: 301-318 (1967)
- 162 Starzl TE, Weil R III, Iwatsuki S, Klintmalm GBD, Schröter GP, Koep LJ,
Iwaki Y, Terasaki PI, Porter
The use of Cyclosporin A and Prednisone in cadaver kidney transplantation.
Surg Gynecol Obstet 151: 7 (1980)
- 163 Sticherling M
Monoklonale Antikörper in Diagnostik und Therapie.
Sandorama 1: 13-23 (1994)
- 164 Streilein JW, Strome P, Wood PJ
Failure of in vitro assays to predict accurately the existence of neonatally
induced H-2 tolerance.
Transplantation 48: 630 (1989)
- 165 Synder DS, Unanue ER
Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and Interleucin I
production.
J Immunol 129: 1803 (1982)
- 166 The US Multicenter FK 506 Liver Study Group
A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for
immunosuppression in liver.
N Engl J Med 331: 1110-1115 (1994)
- 167 Thiel G, Bock A, Landmann J, Mihatsch M
Komplikationen der Immunsuppression.
Klin Mbl Augenheilk 202: 479-484 (1993)
- 168 Thomson AW, Starzl TE
New immunosuppressive drugs: mechanistic insights and potential therapeutic
advances.
Immunol Rev 136: 71-98 (1993)
- 169 Tilney NL, Kupiec-Weglinski
Advances in the Understanding of Rejection Mechanisms.
Transplant Proc 21 (1): 10-13 (1989)
- 170 Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW
The Biology of Acute Transplant Rejection.
Ann Surg 214 (2): 98-106 (1991)
- 171 Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW, Strom TB
T cells and their products in host responsiveness to organ allografts.
Prog Clin Biol Res 224: 21 (1986)

-
- 172 Transplantationsgesetz - TPG
Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen.
BGBl. I S. 2631 (1997)
- 173 Uhteg LC, Salomon DR, Rocher LL, Kupiec-Weglinski JW, Araujo JL, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB
Cyclosporine-induced transplantation unresponsiveness in rat cardiac allograft recipients: in vitro determination of helper and suppressor activity.
J Immunol. 135(3):1800-1805 (1985)
- 174 Venekateswara Rao K
Mechanism, pathophysiology, diagnosis and management of renal transplant rejection.
Med Clin North Am 74: 1039-1057 (1990)
- 175 Vial T, Choquet-Kastylevsky G, Descotes J
Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system.
Toxicology 174: 3-11 (2002)
- 176 Voronoy U
Sobre el bloqueo del aparato reticuloendotelial del hombre en algunas formas de intoxicacion del rinon cadaverico como metodo de tratamiento de la anuria consecutiva a aquella intox.
Siglo med 97: 296 (1936)
- 177 Wasowska B, Baldwin WM 3rd, Sanfilippo F
IgG alloantibody responses to donor-specific blood transfusion in different rat strain combinations as a predictor of renal allograft survival.
Transplantation 53(1): 175-180 (1992)
- 178 Wasowska BA, Quian Z, Behrens E, Cangello D, Sanfilippo F and Baldwin WM III
Inhibition of Acute Cardiac Allograft Rejection in Immunoglobulin-Deficient Mice.
Transplant Proc. 31: 136 (1999)
- 179 Webb WR, Howard HS
Restoration of function of the refrigerated heart.
Surg Forum 8: 302 (1957)
- 180 Webb WR, Howard HS, Neely WA
Practical method of homologous cardiac transplantation.
J Thorac Surg 37: 361-366 (1959)

-
- 181 Welch CS
A note on transplantation of the whole liver in dogs.
Transplantation Bull 2: 54 (1955)
- 182 Williams CS
Some observations on the length of survival and function of homogenous
kidney transplants. Preliminary report.
J Urol 10: 275 (1923)
- 183 Winkler EA
Ernst Unger: a pioneer in modern surgery.
J Hist Med Allied Sci Jul;37(3): 269-86 (1982)
- 184 Winkler M, Christians U
A risk-benefit assessment of tacrolimus in transplantation.
Drug Safety 12: 348-357 (1995)
- 185 Wonigeit K
Gegenwärtiger Stand der Immunsuppression bei der Organtransplantation.
Chirurg 59: 447-453 (1988)
- 186 Wonigkeit K
Immunsuppression bei Organtransplantation.
Internist 37: 229 (1996)
- 187 Yoshimura N, Oka T
Medical and surgical complications of renal transplantation.
Med Clin North Am 74: 1025-1037 (1990)

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. K. Schwemmler danke ich für die Möglichkeit, die Versuche in seiner Klinik durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. S. Korom, der mir nicht nur das Thema für diese Arbeit überlassen hat und mich tatkräftig bei der Durchführung dieser Aufgabe unterstützte. Vielmehr erwies er sich als ein sehr engagierter und äußerst hilfsbereiter Betreuer. Herr Dr. Korom hat mir jederzeit bei Problemen und Fragen zur Verfügung gestanden und mir ermöglicht, eigene Ideen in diesem Projekt zu entwickeln und zu verwirklichen. Er zeigte sich auch bei Rückschritten stets geduldig und verstand es durch seine außerordentliche didaktische Kompetenz immer wieder neue Motivation zu erzeugen und mir das komplexe Gebiet der Transplantationsimmunologie mit Spaß näher zu bringen. Herr Dr. Korom weckte und förderte durch diese Zusammenarbeit maßgeblich mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten.

Den medizinisch technischen Assistentinnen des wissenschaftlichen Labors, Frau P. Freitag, Frau C. Gog und Frau S. Wilker möchte ich für die große Hilfe und die sehr entgegenkommende Unterstützung bei den *in vitro* Versuchen danken. Vor allem möchte ich mich hier bei Frau R. Pläß bedanken, die sich weit über ihr Tätigkeitsfeld hinaus um die Fertigstellung dieser Arbeit bemühte.

Bei Herrn S. Leitner möchte ich mich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung in schwierigen Zeiten bedanken.

Für die permanente Unterstützung während meines Studiums und während der Durchführung dieser Arbeit gebührt meinen Eltern ein ganz besonderer Dank.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Erik Franzen bedanken, ohne den diese Arbeit niemals begonnen worden wäre und der mit mir die Methode der orthotopen Nierentransplantationstechnik in der Ratte in Gießen etablierte.

ERKLÄRUNG

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Zürich, 22.11.2002

Florian Johannes Jung

LEBENS LAUF

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Florian Johannes Jung
	Anschrift:	Hildastraße 5 CH-8004 Zürich
	Geburtsdatum und Ort:	23.03.1970 in Gießen
	Familienstand:	ledig
	Konfession:	römisch / katholisch
<u>Schulbildung:</u>	1976 - 1980	Grundschule Braunfels
	1980 - 1986	Gymnasium Philippinum Weilburg
	1986 - 1989	Goetheschule Wetzlar
		Abschluss: Allg. Hochschulreife
<u>Zivildienst:</u>	01.01.90 - 31.03.91	Malteser Hilfsdienst Wetzlar Ausbildung zum Rettungssanitäter
<u>Studium:</u>	Oktober 92 - Oktober 99	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen und an der Leopold- Franzen-Universität Innsbruck (Österreich)
<u>Beruf:</u>	01.07.00 – 31.12.01	Abschluss: Staatsexamen Arzt im Praktikum im Zentrum für Traumatologie, Abteilung für Plastische- und Handchirurgie/ Brand- verletztzentrum des Städtischen Klinikums St. Georg in Leipzig.
	Seit 01.03.02	Assistenzarzt im Depart. Chirurgie, Abteilung für Thoraxchirurgie des Universitätsspitals Zürich, Schweiz
<u>Nebentätigkeiten:</u>	1989 - 1997	Malteser Hilfsdienst Wetzlar: Ehrenamtliche Tätigkeiten mit Einsatz auf RTW und NAW
	1994 - 1996	Universitätskliniken Gießen: Tätigkeit als Nachtwache auf den Intensivstationen der chirurgischen Kliniken
	SS 95 - SS 96	Universitätskliniken Gießen: Tätigkeit als Assistent in der Physiologie
	seit 1995	Lizensierter Fitness-Trainer: Einsatz in verschiedenen Sport- und Fitnessanlagen mit Leitung von Herz-Kreislauf-Trainingsgruppen und Rückenschulen
<u>Dissertation:</u>		Beginn im Dezember 1997. Thema: „Gemcitabin im Modell der akuten und akzelerierten Transplantatab- stoßung.“ Medizinisches Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie, Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. med. K. Schwemmler).

Zürich, den 22. November 2002

Gemcitabine in Models of Acute and Accelerated Rejection

F. Jung, S. Wilker, E. Maas, M.D. Brendel, H. Grimm, and S. Korom

THE 2',2'-DIFLUORODEOXYCYTIDINE (dFdC, gemcitabine) is a novel chemotherapeutic agent for treatment of a diversity of solid tumors.¹ Incorporation into DNA of the phosphorylated triphosphate of dFdC inhibits DNA-synthesis and leads to cell death. Recently, dFdC has been shown to inhibit acute rejection of cardiac allografts in rats, significantly prolonging transplant (Tx) survival.² This prompted us to further investigate the immunosuppressive effect and mechanism of dFdC in models of experimental organ rejection.

MATERIALS AND METHODS

Transplantation Models

For acute rejection, LEW recipients received cardiac or renal allografts from LBNF1 donors. Hearts were heterotopically placed and microsurgically anastomosed to the abdominal great vessels. Left renal allografts were end-to-end anastomosed and positioned orthotopically. Without treatment, transplanted organs were rejected within 7

to 8 days. Cardiac function could easily be monitored by palpation. After nephrectomy of the syngeneic kidney on day 7 posttransplantation, renal graft performance was determined by survival. For accelerated rejection (ACCR) LEW recipients were sensitized with BN skin transplants 7 days before heterotopic engraftment of a LBNF1 heart. In untreated controls, rejection occurred within 24 to 36 hours.

Treatment

Treated recipients received 130 to 150 $\mu\text{g/kg}$ of dFdC daily subcutaneously starting at the day of organ (acute models) or skin (ACCR model) transplantation.

From the Department of General and Thoracic Surgery (F.J., S.W., E.M., H.G., S.K.) and III. Medical Department & Polyclinic (M.D.B.), Justus Liebig University, Giessen, Germany.

Address reprint requests to Dr S. Korom, Division of Thoracic Surgery, University Hospital, Raemistrasse 100, 8091 Zurich, Switzerland.

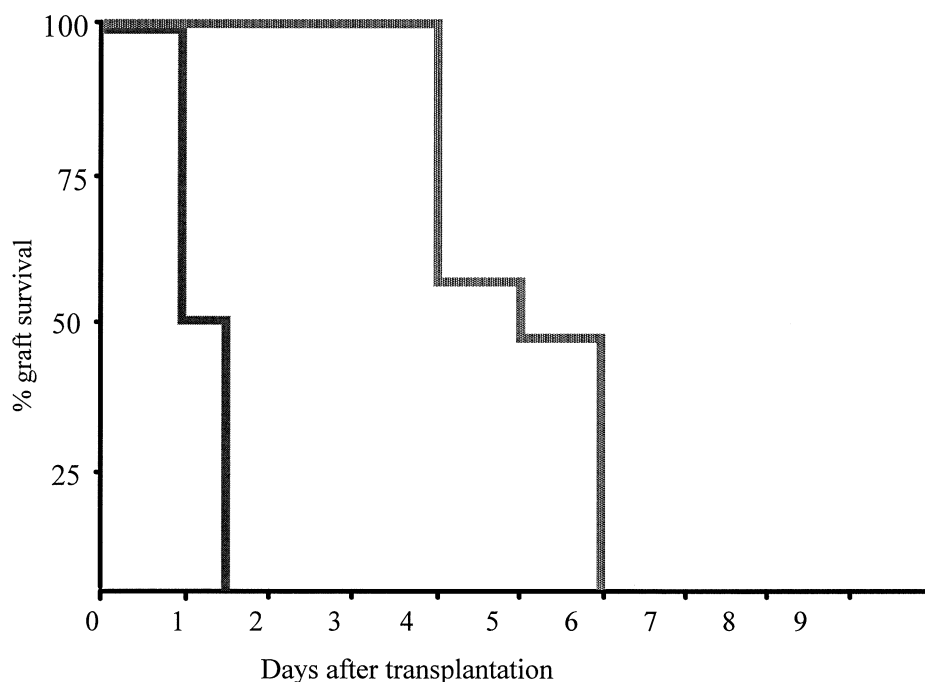


Fig 1. Effect of gemcitabine treatment (150 $\mu\text{g/kg}$ per day subcutaneously starting on day of skin transplantation) on accelerated rejection of LBNF1 cardiac allografts in sensitized LEW recipients. Black: control group. Gray: treated group. Note: Gemcitabine abrogated ACCR in all treated animals ($n = 7$), extending Tx survival up to 5 ± 0.9 days.

Assays

Mixed lymphocyte reaction and cytotoxicity assays were previously described.³ Assessment of circulating total (Turbiquant, Dade Behring, Marburg, Germany) and allospecific (as described³) immunoglobulin (Ig) IgM and IgG was performed.

RESULTS AND CONCLUSION

Gemcitabine therapy abrogated acute rejection of heterotopic cardiac and orthotopic renal Tx, significantly prolonging graft survival. In LEW recipients of LBNF1 cardiac grafts ($n = 8$) receiving 130 $\mu\text{g/kg}$ per day dFdC subcutaneously, the mean organ survival was 37.1 ± 13.6 days ($P < .003$). In orthotopic renal grafts ($n = 5$) in the same donor/recipient combination treated with 150 $\mu\text{g/kg}$ per day, dFdC transplant survival was 69.5 ± 40.1 days ($P < .001$).

In a model of ACCR, where LEW recipients, sensitized with BN skin transplants (day -7) were treated, starting at time of skin Tx, with 150 $\mu\text{g/kg}$ per day dFdC, gemcitabine abrogated ACCR in all treated animals ($n = 7$), extending Tx survival from 24 to 36 hours to 5 ± 0.9 days ($P < .0001$) (Fig 1).

We analyzed the total circulating IgM and IgG in recipients of kidney and cardiac (Fig 2) allografts. For either graft, both Ig classes were significantly suppressed for more than 21 days posttransplantation (cardiac Tx: $P < .02$ IgG/M; renal Tx: $P < .02/.007$ IgG/M).

Analysis of allospecific Ig following transplantation showed a complete and lasting abrogation of both IgM and IgG antibodies (data not shown).

MLR showed decreased relative proliferation indices (0.21, 0.32) with complete inhibition of cytotoxicity ($n = 4$) in the treated recipients at day 6 posttransplantation.

Gemcitabine is a potent novel immunosuppressive agent that abrogates acute and accelerated rejection. During therapy with dFdC, no allospecific antibodies could be

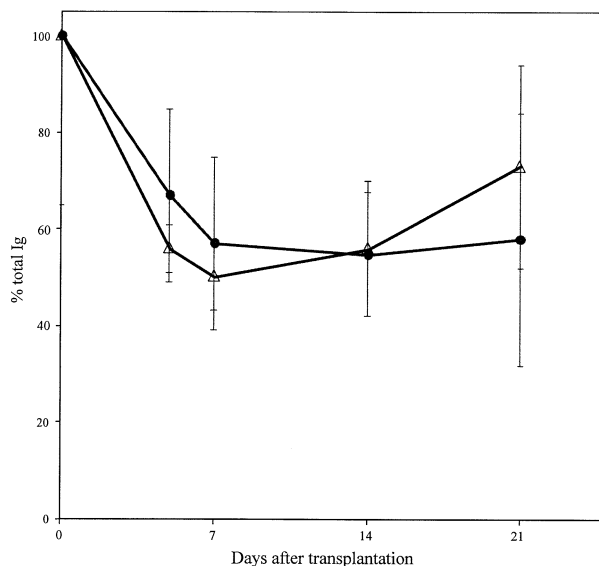


Fig 2. Effect of gemcitabine treatment (130 $\mu\text{g/kg}$ per day subcutaneously) on total IgM (triangles) and IgG (circles) in LEW recipients of LBNF1 cardiac allografts.

detected, and total Ig titers were markedly decreased in recipients. Cytotoxicity was abrogated, and T-cell proliferative responses were down-regulated. Initially viewed as a chemotherapeutic drug, gemcitabine may well serve as a promising novel immunosuppressive adjunct in antirejection therapy in transplantation medicine.

REFERENCES

1. Kayne B: J Clin Oncol 12:1527, 1994
2. Margreiter R, Fischer M, Roberts K, et al: Transplantation 68:1051, 1999
3. Korom S, De Meester I, Stadlbauer THW, et al: Transplantation 63:1495, 1997